

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

# Caracterización de la función de Espinofilina y de su capacidad de actuar como supresor tumoral in vivo

IRENE FERRER SÁNCHEZ, LICENCIADA EN FARMACIA.  
DIRECTOR: AMANCIO CARNERO MOYA.  
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS  
(CNIO)



*A todas las personas que me han apoyado  
en mi decisión de dedicarme a  
esa cosa llamada "ciencia"*





El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Grupo de Desarrollo de Ensayos, del Departamento de Terapias Experimentales del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la dirección del **Dr. Amancio Carnero Moya**.

Ha sido realizado con una beca de formación de personal universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.



# Agradecimientos

Por fin, por fin he llegado al final de esta larga etapa de 4 años, y si he llegado hasta aquí, ha sido gracias a la ayuda y el apoyo de mucha gente que merece un huequito en esta tesis. Quiero empezar dándole las gracias a mi director de tesis, Amancio, gracias por aceptarme en tu grupo, por enseñarme tantas cosas, pero sobre todo, por confiar tanto en mí, incluso más de lo que podía confiar yo en mí misma, por darme seguridad y ayudarme a crecer, no va a ser fácil encontrar otro jefe como tú, gracias.

El principio de esta etapa fue bastante duro, pero hubo algunas personas que se encargaron de hacérmelo un poco más fácil. Valle, que le puedo decir a mi mejor profe, no ha habido nadie que me haya ayudado tanto como tú, en todos los aspectos, no sabes cuanto te lo agradezco, un trocito de esta tesis es tuya, espero que no sea el único trabajo que compartimos, trabajar contigo es un placer, eres la mejor. Arantxa, qué hubiera hecho yo sin tu ayuda en esos momentos de desesperación, sin nuestras escapadas para olvidar los malos ratos y sin nuestras conversaciones para arreglar el mundo, gracias por tantos momentos. Estrella, gracias por tu apoyo, tus consejos y por dejarme participar en parte de tu trabajo. Fernando, gracias por tu ayuda en mi introducción al fabuloso mundo de las PCRs, hiciste que todo fuera más fácil. Jesús, gracias por tus consejos y por hacer del laboratorio un lugar más ameno.

También quiero dar las gracias a todos los que habéis estado conmigo durante toda la tesis. Carmen, gracias por todo lo que me has enseñado, eres la persona a la que más veces he podido y he querido acudir, siempre has estado ahí, no se que habría hecho sin ti, sabes que eres mi ídolo, que quiero ser como tú. Juanfe, gracias por preocuparte por mí en todo momento, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por hacer más fácil el día a día en el trabajo, sabes que te admiro muchísimo. Fabián, compañero de tesis, gracias por tu ayuda, tus consejos, los ánimos, por tantos buenos y malos momentos que hemos compartido, va a ser difícil encontrar a un compañero como tú. Yoli, gracias por enseñarme tantas cosas de esos bichitos que tanto trabajo nos han dado, por ayudarme en todo lo que he necesitado, por escucharme, por animarme y por preocuparte tanto por mí. Wolf, gracias por las ideas y por tu apoyo. Oli, gracias por tu ayuda y por los ánimos. Bea, Belén, Maja, gracias por los momentos que hemos compartido y por vuestro apoyo.

Y como no, quiero dar las gracias a los que han estado conmigo en el último tramo de esta etapa, el tramo más duro, pero gracias a vosotros y a tantos momentos juntos lo habéis hecho

mucho más fácil. Cris, que puedo decir después de casi 10 años sin separarme de ti, gracias por estar siempre ahí y ayudarme en todo lo que he necesitado, por escucharme, por entenderme, por darme fuerzas y apoyo, por ser la persona a la que siempre puedo acudir, las 24 horas. Esther, gracias por apoyarme y animarme a pesar de estar tan ocupada, tenías razón, al final se ve la luz, iyo ya la he visto! Mer, gracias por ayudarme, por preocuparte por mí, por animarme incluso cuando nadie sabía que lo necesitaba, por formar parte de esa familia que escogemos. Azu, gracias por saber estar ahí cuando lo he necesitado, por tus palabras y tus silencios. David, gracias por tu ayuda, por tus consejos, por las "discusiones" y por tantas risas que han hecho más fácil el día a día. Geno, mi amiga invisible, gracias por tus palabras de apoyo, por creer en mí, por hacerme sonreír. Sandra, gracias por ayudarme con los últimos experimentos, por animarme y apoyarme en los momentos más duros. Natalia, gracias por ayudarme con la impresión y la encuadernación.

También quiero dar las gracias a otros amigos que he hecho durante esta etapa y que siempre han estado apoyándome y preocupándose por mí, Arancha, Inés, Ana, Mila, gracias. Y también a mis amigos de siempre, simplemente gracias por estar siempre ahí.

En definitiva, gracias a todos por hacer del laboratorio mi segundo hogar, por conseguir que ir trabajar no fuera tan duro, a pesar de lo duro que es este trabajo. Me he sentido muy a gusto con todos vosotros, me va a dar mucha pena dejaros.

No puedo olvidarme de los profesores que me hicieron ver que la ciencia era mi profesión, especialmente a Jesús y Fede, que me dieron la oportunidad de empezar mi andadura por la ciencia, gracias.

Y por último, pero no por eso menos importante, quiero dar las gracias a toda mi familia por apoyarme y confiar en mí. Pero especialmente a mis padres, porque sin vosotros nunca habría llegado hasta aquí, por vuestro apoyo incondicional, por vuestra confianza en mí, por dejarlo todo por ayudarme y cuidarme, por vuestros sabios consejos, por todo, gracias. Y a mi hermana, gracias por buscar la manera de venir a verme en los peores momentos, por apoyarme y preocuparte por mí. Y a Samir, gracias por estar siempre a mi lado, por apoyarme en todo lo que hago, por cuidarme y por hacerme creer que puedo con todo, una vez más tenías razón: ¡he podido!.

# Summary

Cancer is a genetic disease that arises from an accumulation of genetic and/or epigenetic alterations that liberates tumour cells from the homeostatic mechanisms that govern normal cell proliferation. Senescence is one of these homeostatic mechanisms that is activated by several kind of stress and acts as a tumour suppressor mechanism both *in vitro* and *in vivo*. The knowledge of the signalling pathways that control senescence would allow the identification of new antitumor treatments. For this reason a loss-of-function genetic screen was performed in order to identify genes controlling replicative senescence that might act as tumour suppressors. Thus, Spinophilin (Sph) was identified. Sph is a scaffolding protein that binds and regulates the function of many proteins such as the protein phosphatase 1 $\alpha$  (PP1 $\alpha$ ).

In this work, we have studied the molecular mechanism through which Sph could be implicated in the tumorigenic process. In different cell models, we observed that the absence of Sph produced a decrease in Ppp1ca protein levels, the catalytic subunit of PP1 $\alpha$ . This reduction caused an increase in the hiperphosphorylated status of pRB and consequently an increase in p53 protein levels. This increase in p53 protein levels in the absence of Sph was mediated by ARF and was more evident in response to DNA damage. Furthermore, the Sph absence-mediated increased activation of p53 forced that cellular immortalization always occurred through *p53* mutation. Then, once *p53* was mutated, the absence of Sph increased tumorigenic properties, suggesting a role of Sph as a tumour suppressor in the absence of p53. On the other hand, the overexpression of Sph reduced the growth of human tumour cell lines regardless of pRb and p53 status, in a similar way to Ppp1ca. This role of Sph as a tumour suppressor was supported by the Sph loss in different human cell lines.

In order to confirm the role of Sph as a tumour suppressor *in vivo*, the effect of the absence of Sph in different mouse models was analyzed. We observed that the absence of Sph reduced the survival, increased the number of some tumours and benign lessons and cooperated with other tumour alterations such as a constitutive active *akt*, the heterocigous absence of *p53* and *p53* mutation.

Finally, we studied the relevance of the absence of Sph in human tumours. A significant number of kidney and lung tumours showed reduce levels of *Sph* mRNA and a significant number of mammary tumours showed absence of Sph protein. Moreover, the absence of Sph was correlated with malignant tumour states; this suggested a possible application as a tumorigenic marker. We also observed a correlation between Sph loss and *p53* mutation, supporting our hypothesis in which Sph would act as a tumour suppressor in absence of p53.



# Resumen

El cáncer surge de la acumulación de alteraciones genéticas y/o epigenéticas que liberan a las células tumorales de los mecanismos homeostáticos que controlan la proliferación celular. La senescencia es uno de esos mecanismos que actúa en la supresión tumoral *in vitro* e *in vivo*. El conocimiento de las vías de señalización que controlan la senescencia permitiría generar nuevos tratamientos antitumorales. Por ello se realizó un rastreo genético para identificar genes críticos en la senescencia que pudieran actuar como supresores tumorales. Así, se encontró a Espinofilina (Sph), una proteína de anclaje que se une y regula la función de gran número de proteínas, como la proteína fosfatasa 1α (PP1α).

En este trabajo hemos estudiado el mecanismo molecular a través del cual Sph podía estar implicada en el proceso tumorigénico. Para ello utilizamos diferentes modelos celulares en los que observamos que la ausencia de Sph producía una disminución de los niveles de la subunidad catalítica de PP1α, Ppp1ca, favoreciendo así la hiperfosforilación de pRb y por tanto su inactivación. Esto provocaba un aumento de la proliferación y un aumento de p53. Este aumento de p53 en ausencia de Sph estaba mediado por ARF y era más evidente en respuesta al daño en el ADN, además, forzaba que la inmortalización celular ocurriera siempre a través de la mutación de *p53*. Sin embargo, una vez mutado *p53*, la ausencia de Sph aumentaba ciertas propiedades tumorales de las células, lo que sugería que Sph pudiera comportarse como un supresor tumoral en ausencia de p53. Por otro lado, la sobreexpresión de Sph, al igual que Ppp1ca, reducía el crecimiento y/o supervivencia de diferentes líneas celulares tumorales humanas independientemente del estado de pRb y p53, esto sugería que Sph a través de Ppp1ca también podía actuar en la supresión tumoral por otros mecanismos. Este papel de Sph como supresor tumoral se vio reforzado por la observación de la pérdida de expresión de Sph en algunas líneas celulares.

Para comprobar el papel de Sph como supresor tumoral *in vivo*, analizamos el efecto de la ausencia de Sph en diferentes modelos animales. Comprobamos que la ausencia de Sph reducía la media de supervivencia, aumentaba la incidencia de determinados tipos de tumores y lesiones benignas y cooperaba con otras alteraciones con potencial tumoral como la activación constitutiva de Akt, la pérdida en hemicigosis de *p53* y la mutación de *p53*<sup>172R-H</sup>.

Por último, estudiamos la relevancia de la pérdida de Sph en tumores humanos. Comprobamos que un número significativo de tumores veían reducidos los niveles de ARNm de *Sph*, y otros de la proteína Sph. Además, comprobamos que la pérdida de Sph se correlacionaba con la progresión tumoral sugiriendo su utilización como marcador de tumorigenicidad. También observamos una correlación de la pérdida de Sph con la mutación de *p53* lo que reforzaba nuestra teoría del papel de Sph como un supresor tumoral en ausencia de p53.





## Índice

---



<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>XIII</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>XIX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Cáncer.	3
2. Senescencia como mecanismo de supresión tumoral.	7
3. Vías de señalización de los supresores tumorales p53 y pRb como las vías centrales en la activación de senescencia.	9
4. Rastreo genético por pérdida de función como herramienta para encontrar nuevos genes supresores de tumores.	15
5. Espinofilina.	17
<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
1. Reactivos biológicos usados.	29
2. Técnicas básicas de biología molecular.	29
2.1. Transformación de células electrocompetentes (electroporación).	29
2.2. Transformación de células quimiocompetentes.	30
2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	30
2.4. Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa.	30
2.5. Clonaje de productos de PCR.	31
2.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción.	31
2.7. Ligación.	31
2.8. Extracción de ADN plasmídico.	31
3. Cultivos celulares.	32
3.1. Líneas celulares.	32
3.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares.	33

3.3. Generación de MEFs.	33
3.4. Transfección de células.	33
3.5. Selección de células transfectadas o infectadas.	34
3.6. Infección retroviral.	34
3.7. Generación de la librería de fragmentos antisentido de ratón y transducción de MEFs presenescentes.	35
3.8. Recuperación de provirus.	35
<b>4. Ensayos celulares.</b>	<b>35</b>
4.1. Protocolo 3T3 para MEFs.	35
4.2. Actividad $\beta$ -Gal asociada a senescencia.	36
4.3. Tratamientos de MEFs.	36
4.4. Ensayos de tumorigénesis.	36
4.5. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.	38
<b>5. Ensayos con ratones.</b>	<b>38</b>
5.1. Líneas de ratones utilizadas.	38
5.2. Genotipaje de las líneas utilizadas.	38
5.3. Mantenimiento de las colonias experimentales.	39
5.4. Ensayos carcinogénicos.	39
5.5. Necropsia y análisis patológico.	40
5.6. Análisis estadístico de los datos obtenidos de los ensayos con ratones.	40
<b>6. Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN.</b>	<b>41</b>
6.1. Extracción de ARN total.	41
6.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	41
6.3. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR).	42
6.4. Hibridación de una matriz de ARN.	42
<b>7. Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteína.</b>	<b>43</b>
7.1. Anticuerpos.	43
7.2. Extracción de proteína total.	43
7.3. Western blot.	44
7.4. Cuantificación de bandas de Western blot.	45
7.5. Inmunofluorescencia (IF).	45
7.6. Inmucitoquímica (ICQ).	46
7.7. Inmunohistoquímica (IHQ).	46
<b>R E S U L T A D O S</b>	<b>47</b>
<b>1. Estudio del papel celular de Sph y su relación con pRb y p53.</b>	<b>49</b>

1.1. Efecto de la ausencia de Sph en el proceso de senescencia. _____	49
1.2. Efecto de la ausencia de Sph sobre Ppp1ca. _____	51
1.3. Efecto de la ausencia de Sph sobre el supresor tumoral producto del gen <i>retinoblastoma</i> , pRb. _____	53
1.4. Efecto de la ausencia de Sph sobre el supresor tumoral p53. _____	57
1.5. Efecto de la ausencia de Sph sobre ARF. _____	62
1.6. Sph como supresor tumoral en modelos celulares. _____	65
<b>2. Sph como supresor tumoral en modelos animales. _____</b>	<b>70</b>
2.1. Caracterización de los ratones Sph KO. _____	70
2.2. Estudio fenotípico de las colonias de animales defectivos para la expresión de Sph. _____	71
2.3. La ausencia de Sph coopera con la activación de Akt. _____	74
2.4. La ausencia de Sph coopera con la pérdida de p53. _____	76
2.5. La ausencia de Sph coopera con la mutación de <i>p53</i> . _____	79
<b>3. Sph como supresor tumoral en tumores humanos. _____</b>	<b>81</b>
3.1. La expresión de Sph se pierde en algunos tumores humanos. _____	81
3.2. La ausencia de Sph se correlaciona con el estadio del tumor. _____	83
3.3. La pérdida de expresión de Sph en tumores se correlaciona con la mutación en p53. _____	84
<b>DISCUSIÓN _____</b>	<b>87</b>
<b>CONCLUSIONES _____</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA _____</b>	<b>101</b>



# Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

CDK: kinasa dependiente de ciclina.

C-terminal: extremo carboxi terminal de la proteína.

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.

EDTA: ácido etilen diamino tetracético.

Eto: Etopósido

FACS: citometría de flujo.

FBS: suero fetal bovino.

GEF: factor intercambiador del nucleótido guanina.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxido de hidrogeno.

ICQ: inmunocitoquímica.

IF: inmunofluorescencia

IHQ: inmunohistoquímica.

IP: yoduro de propidio.

KO: Knockout.

KI: Knockin.

LB: medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani.

MEFs: fibroblastos embrionarios de ratón

M&M: materiales y métodos.

N-terminal: extremo amino terminal de la proteína.

Pb: pares de bases.

PBS: tampón fosfato salino.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDZ: PSD-95/DlgA/ZO-1.

PP1: proteína fosfatasa 1.

PP1c: subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1.

Ppp1ca: subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1, isoforma  $\alpha$ .

PP1 $\alpha$ : proteína fosfatasa 1, isoforma  $\alpha$ .

RGS: reguladores de la señalización de las proteínas G.

RT-PCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa.

SDS: dodecil sulfato sódico.

shRNA: horquilla corta de RNA, complementaria a ARNm.

Sph: Espinofilina

3MC: 3-Metil-Colantreno

WB: Western Blot



## Introducción

---



## 1. Cáncer.

El **cáncer** es una enfermedad genética, que engloba un conjunto de más de cien enfermedades, que tienen en común un crecimiento celular incontrolado y una invasión del tejido adyacente sano y de otros tejidos no adyacentes.

El proceso de desarrollo tumoral o **tumorigénesis** es un proceso multifásico que consiste en una serie de cambios genéticos y/o epigenéticos que confieren algún tipo de ventaja selectiva respecto al entorno, lo que lleva a una conversión progresiva de las células normales en células cancerígenas (101).

La mayoría de los tejidos humanos adultos mantienen células en división para reparar y regenerar los tejidos. De ahí que el mantenimiento de la **homeostasis** tisular, de acuerdo a las necesidades de cada tejido, esté estrictamente regulado a través del control de los procesos de los que depende. Tres de estos procesos son la proliferación celular, la apoptosis y la senescencia.

- El control de la tasa de **proliferación celular** se establece a través de las señales extracelulares y de los tres puntos de control que regulan el ciclo de división celular. El punto de control situado en la transición de fase G1 a fase S, el situado en la transición de fase G2 a fase M y el situado en plena mitosis. Gracias a este triple control, las células sólo inician una nueva fase de división cuando se han cumplido las condiciones necesarias en cada punto y se ha finalizado la fase anterior.
- La **apoptosis** o muerte celular programada es un mecanismo fisiológico de eliminación de células como parte del recambio celular necesario para contrarrestar la formación continua por división celular. Para que la apoptosis tenga lugar, se requieren señales positivas extracelulares e intracelulares que la induzcan y ausencia de señales que la bloqueen.
- La **senescencia** es un mecanismo fisiológico que impide la proliferación de células más allá de un límite determinado por la longitud de los telómeros y que puede ser activada por determinados mecanismos de estrés.

A pesar del estricto control para regular la homeostasis tisular, ocurren alteraciones genéticas que producen una excesiva proliferación y una reducción en la apoptosis y en la senescencia, que rompen el equilibrio favoreciendo la progresión tumoral.

El cáncer tiene su origen en **alteraciones en el genoma** que pueden ocurrir a nivel genético, a través de alteraciones a nivel molecular o cromosómico, o a nivel epigenético, a través de un cambio en el patrón de expresión debido a modificaciones secundarias de la cromatina o cambios en la metilación del ADN. Tanto las alteraciones genéticas como las epigenéticas causantes del proceso tumoral ocurren sobre tres tipos de genes: los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN.

- Los **oncogenes** son alelos hiperactivos o desregulados de **protooncogenes**, que son genes promotores del crecimiento normal que actúan como inductores de la proliferación celular. La mutación o sobreexpresión de estos genes contribuye a que la célula se convierta en tumoral. La activación oncogénica se produce a través de translocaciones cromosómicas, amplificaciones génicas y mutaciones intragénicas. Los oncogenes son dominantes, lo que significa que una sola copia puede causar que la célula exprese el fenotipo alterado, independientemente de la presencia de un alelo normal en el cromosoma homólogo. Aunque en general existe efecto de dosis.
- Los **genes supresores de tumores** actúan como un freno para la proliferación celular. Una mutación que inactive uno de estos genes libera a la célula de las restricciones normales a la división y provoca una excesiva proliferación. La inactivación de supresores tumorales ocurre a través de mutaciones que alteran su actividad o dan lugar a una proteína trunca, deleciones, inserciones o silenciamiento epigenético. En una célula diploide normal hay dos alelos de cada supresor tumoral, para que se favorezca la tumorigénesis, en general, se deben inactivar o perder ambas copias ya que estos genes son recesivos y una sola copia del gen es suficiente para un control normal. Aunque hay algunos casos en los que la pérdida de un solo alelo del gen supresor de tumores resulta en un fenotipo tumoral.
- Los **genes de reparación del ADN** se encargan de la detección del daño genético y de su reparación, proceso que es continuo y esencial en la supervivencia ya que protege la integridad del genoma. La inactivación de estos genes no afecta directamente al proceso de control de la proliferación, pero incrementa la tasa de mutación de otros genes, entre otros, los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Por tanto, la inactivación de estos genes reparadores acelera la progresión tumoral. Dicha inactivación ocurre igual que la de los genes supresores de tumores y también generalmente la inactivación debe de ser de los dos alelos para que se produzca el efecto fisiológico.

La regulación coordinada de estos tres tipos de genes mantiene la homeostasis de los tejidos, el proceso tumoral refleja por tanto una ruptura en ese equilibrio.

En el proceso de tumorigénesis las células sufren una serie de cambios fisiológicos, es decir, adquieren nuevas capacidades biológicas que les permiten escapar a los mecanismos de defensa antitumoral. Existen seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que dictan el crecimiento maligno (61). Los tumores humanos, en general, comparten estas seis **alteraciones fisiológicas celulares** que se describen a continuación:

- **Independencia de señales de crecimiento.** Las células normales necesitan de la presencia de señales mitogénicas para activar su división. Las células tumorales reducen su dependencia a esta estimulación exógena de la proliferación. En este proceso interviene la activación oncogénica, muchos oncogenes activan constitutivamente las rutas de señalización en las que intervienen haciendo innecesaria la activación exógena de la ruta. Un ejemplo muy común de este tipo de activación oncogénica es la mutación del protooncogén *Ras* (3, 14) que activa la cascada Raf-MAPK con independencia de la presencia de factores de crecimiento.
- **Insensibilidad a señales antiproliferativas.** En un tejido normal, numerosas señales antiproliferativas se encargan de mantener la quiescencia celular y la homeostasis tisular. La mayoría de las señales antiproliferativas convergen en la proteína pRb, activándola y produciendo la parada, reversible o irreversible, de la proliferación celular. Por este motivo, para que el proceso tumoral progrese, las células tumorales deben hacerse insensibles a estas señales, de ahí que esta ruta supresora de tumores se encuentre alterada frecuentemente en numerosos tipos de tumores (25).
- **Resistencia a la muerte celular programada (apoptosis).** La capacidad de expansión de una población tumoral, no depende sólo de la tasa de proliferación, sino también de la tasa de muerte celular. La apoptosis es una de las barreras antitumorales más importantes que debe ser evadida por la célula tumoral para que el proceso tumoral progrese. Las células cancerígenas adquieren resistencia a la apoptosis de diferentes maneras, pero la más habitual es la pérdida del supresor tumoral p53 que es el regulador proapoptótico más importante. La mayoría, sino todos, los cánceres humanos tienen alterada esta ruta de supresión tumoral (83).
- **Potencial replicativo ilimitado.** Las células somáticas poseen un potencial replicativo limitado, esto significa que, tras un número determinado de divisiones, dejan de crecer y entran en un estado irreversible de senescencia replicativa (66), en este estado las células son viables pero insensibles a señales de crecimiento y proapoptóticas. Se sabe que la senescencia replicativa ocurre como consecuencia del acortamiento telomérico, el cual es debido a la incapacidad de las células humanas de replicar los extremos de los cromosomas (57, 63). Para una progresión

tumoral maligna resulta esencial que las células tumorales evadan el proceso de senescencia y adquieran un potencial replicativo ilimitado. La activación de la telomerasa en células tumorales impide el acortamiento telomérico y dota a la célula de ese potencial replicativo ilimitado (13, 76, 131).

- **Promoción de la angiogénesis.** Conforme un tumor progresa, las células tumorales dejan de tener acceso a factores necesarios para su supervivencia y funcionalidad celular. En este punto resulta esencial que las células tumorales adquieran la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que rieguen el tumor para que éste crezca. Para conseguir activar la angiogénesis las células tumorales modifican el equilibrio entre inductores e inhibidores de la angiogénesis, aumentando por ejemplo la expresión de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (146). La vascularización puede asimismo favorecer la migración de algunas células tumorales al torrente circulatorio y así difundirse a otros tejidos donde formará metástasis.
- **Promoción de la invasión y metástasis.** Las células constituyentes de tejidos normales se mantienen unidas entre si y con la matriz extracelular. Ambos tipos de adhesión se ven alterados en el proceso tumoral y, como consecuencia, las células tumorales pueden desprenderse del tejido e invadir otros tejidos normales donde podrán dar lugar a tumores secundarios o metástasis (49, 80). Las células tumorales adquieren la capacidad invasiva a través de la activación de proteasas celulares y de la alteración de moléculas de adhesión. Una alteración muy común que sufren los tumores epiteliales es la inactivación de la molécula de adhesión célula-célula Caderina E que actúa como un molécula supresora de la invasión y metástasis (33).

Estudios recientes sugieren la adición a esta lista de una séptima alteración fisiológica importante para la progresión tumoral, la **inflamación relacionada con el tumor** (91). La activación oncogénica puede activar la producción de moléculas proinflamatorias y reclutar células inflamatorias. En el microambiente tumoral estas células y moléculas inflamatorias influyen en casi todos los aspectos de la progresión tumoral incluyendo la habilidad de las células tumorales de metastatizar (77, 88, 92).

El conocimiento de estas capacidades esenciales para la progresión tumoral adquiridas por las células tumorales, así como el conocimiento de las alteraciones genéticas que las originan y de las vías de señalización que intervienen en cada una de estas propiedades tumorales, ayuda al diseño racional de terapias anticancerígenas dirigidas a impedir la progresión tumoral en diferentes estadios.

## 2. Senescencia como mecanismo de supresión tumoral.

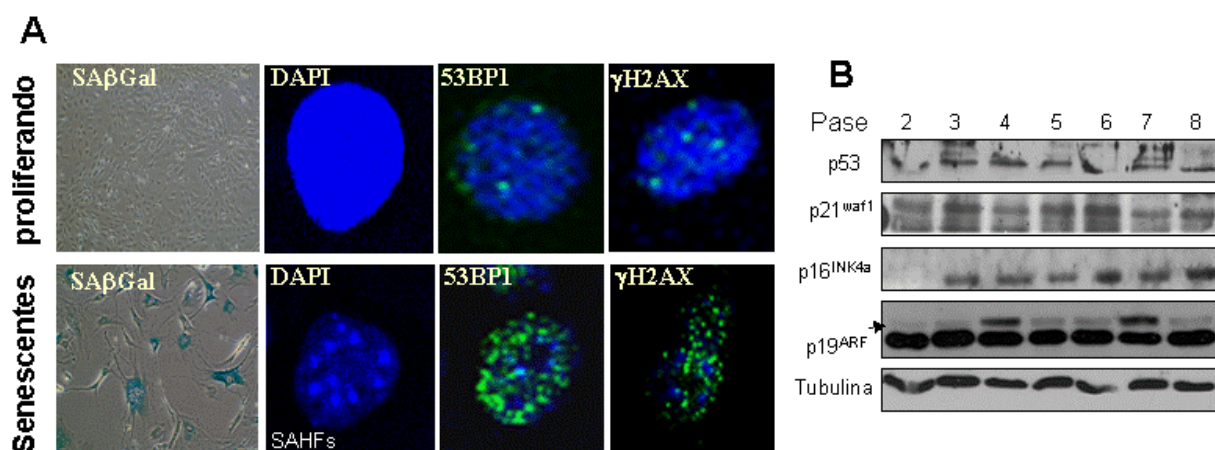
La senescencia es un mecanismo de supresión tumoral que impide la proliferación de las células tumorales incipientes, y que por tanto, debe ser evadido por dichas células para progresar en el proceso de transformación (61). El término senescencia lo aplicó por primera vez Hayflick al observar que las células en cultivo dejaban de crecer tras un determinado número de pases (66). La senescencia replicativa se caracteriza por la pérdida progresiva del potencial proliferativo como consecuencia de la acumulación de duplicaciones celulares, lo que resulta en una parada del ciclo celular irreversible. Actualmente sabemos que la senescencia replicativa ocurre como consecuencia del acortamiento telomérico debido a la incapacidad de las células humanas de replicar los extremos de los cromosomas (13, 57, 63). Sin embargo, la senescencia celular es un proceso más general que no sólo tiene lugar por la acumulación de divisiones celulares (**senescencia replicativa**), sino que también se induce, independientemente de la longitud telomérica, por otros muchos estímulos de estrés (**senescencia prematura**), como son: la activación oncogénica (40, 85, 129, 163), el daño en el ADN (38, 140), el estrés oxidativo (12, 31), la alteración de la cromatina (97, 102, 151), algunos fármacos citotóxicos (114, 140) y algunas moléculas como las ceramidas (147) o el interferon  $\beta$  (96). No importa el mecanismo por el que se induzca la senescencia celular, la cascada de señalización lleva a una parada de crecimiento que parece ser la misma y que involucra a las vías de p53 y pRB (18).

Las células senescentes se distinguen por presentar una serie de características comunes (18, 27) que describimos a continuación:

- **Parada del crecimiento.** Las células senescentes, aunque son metabólicamente activas, detienen su crecimiento de forma permanente e irreversible, es decir, no pueden ser estimuladas por ningún estímulo fisiológico proliferativo y pueden mantenerse en este estado de viabilidad no proliferativa durante meses.
- **Resistencia a apoptosis.** Muchas células senescentes, aunque no todas (60), son insensibles a las señales proapoptóticas, lo que podría explicar porqué las células senescentes son tan estables en cultivo.
- **Cambios morfológicos.** Las células senescentes adquieren una morfología más alargada y aplanada y frecuentemente presentan polinucleación.
- **Expresión génica alterada.** Las células senescentes aumentan la expresión de las proteínas p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, ARF y p21<sup>waf1</sup> (Figura 1B). Además, sobreexpresan proteínas que estimulan el microambiente tisular como proteínas que remodelan la matriz extracelular o que median inflamación local (29, 132, 160) y reprimen la

expresión de genes que codifican proteínas que estimulan o facilitan la proliferación celular como cFos, Ciclinas A y B y PCNA (98, 130).

- **Presentan actividad  $\beta$ -Galactosidasa.** La actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA $\beta$ Gal) se detecta citoquímicamente a un pH subóptimo de 6 mediante la adición de un sustrato cromogénico (X-Gal) (41) (Figura 1A). Esta actividad  $\beta$ -Galactosidasa se deriva del incremento del contenido lisosomal de las células senescentes y resulta un marcador de senescencia muy útil tanto *in vitro* como *in vivo*.
- **Presentan focos de heterocromatina denominados SAHFs** (senescence-associated heterochromatin foci). Estos focos se visualizan microscópicamente como agrupaciones de regiones de heterocromatina teñidas con dapi (Figura 1A), o a través de la trimetilación de la histona 3, o del reclutamiento de la proteína HP1 (98). Los SAHFs se utilizan como marcador de senescencia *in vitro* e *in vivo* en células humanas. En células de ratón no resultan muy útiles ya que pueden confundirse con focos pericentroméricos muy comunes en esta especie y que no están asociados a senescencia (6, 24).
- **Presentan focos de daño en el ADN denominados SDFs** (senescence-associated DNA damage foci). Estos focos resultan de la disfunción telomérica y de otras fuentes de daño al ADN asociadas a la senescencia. Contienen proteínas asociadas con la respuesta al daño en el ADN, como histona H2AX fosforilada y 53BP1 (34, 39, 68) (Figura 1A). Los SDFs se utilizan como marcadores de senescencia *in vitro* e *in vivo*.



**Figura 1 Marcadores de senescencia. (A) Marcadores celulares: SA $\beta$ Gal, SAHFs con Dapi, SDFs con 53BP1 e Histona H2AX fosforilada (Ser139).** Células proliferando (panel superior) y células senescentes (panel inferior). Para la determinación de actividad  $\beta$ -Galactosidasa (SA $\beta$ Gal) se tiñó con X-Gal y se hicieron fotos con un microscopio de contraste de fases. Para la determinación de los focos de heterocromatina (SAHFs) se tiñó con dapi y se hicieron fotos con un microscopio confocal. Para la determinación de los focos de daño en el ADN se realizó una tinción inmunofluorescente frente a 53BP1 y a la histona H2AX fosforilada (Ser139) y se hicieron fotos con un microscopio confocal. **(B) Marcadores moleculares: p21<sup>waf1</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, y p19<sup>ARF</sup>.** Estudio mediante WB de los niveles proteicos de las proteínas p53, p21<sup>waf1</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, y p19<sup>ARF</sup> durante los 8 primeros pases de un protocolo 3T3 en MEFs.



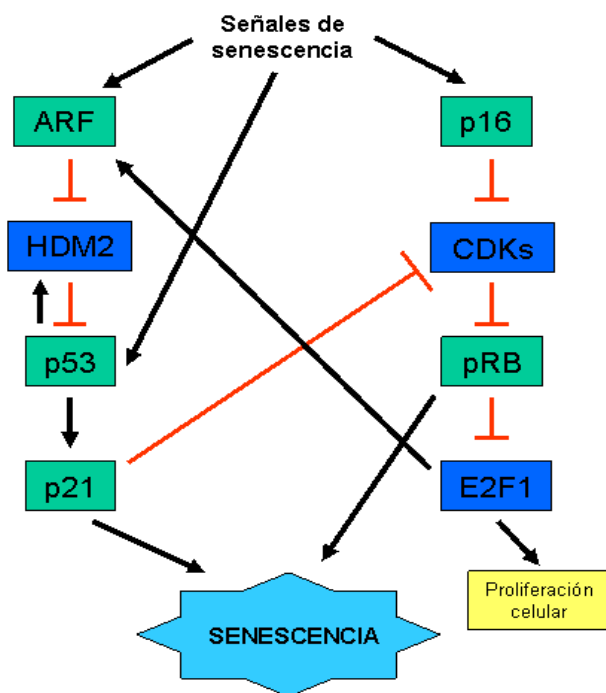
Se ha comprobado que la senescencia inducida por oncogenes ocurre en estados tempranos del desarrollo tumoral tanto en modelos murinos como en modelos humanos (16, 26, 32, 95). Estos datos sugieren que la senescencia inducida por oncogenes actúa como un mecanismo de supresión tumoral que restringe el crecimiento de las células que sufren activación oncogénica, de esta manera, el tumor se mantiene en un estado premaligno, no agresivo. Por tanto, la ausencia de esta senescencia prematura, causada por la inactivación de las vías de señalización que la regulan, permitiría la progresión maligna de estos tumores (16, 32).

Por otro lado, se ha visto que la senescencia no sólo limita la progresión tumoral sino que también es un mecanismo primario de regresión tumoral (148, 157). En un modelo murino de hepatocarcinoma, en el que una vez establecido el tumor se activaba la expresión del supresor tumoral p53, se observó que se inducía senescencia y que las células senescentes provocaban la infiltración al tumor de macrófagos, neutrófilos y células NK que contribuían a la regresión tumoral (157).

Además, se ha comprobado que tras el tratamiento tumoral con varios fármacos citotóxicos se encuentran células senescentes (114, 128, 140). Estos datos junto con la observación de la regresión tumoral producida tras la inducción de senescencia sugieren que una aproximación atractiva para el tratamiento de los tumores sería la utilización de fármacos que induzcan senescencia. Por este motivo, es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos que dirigen el proceso de senescencia y buscar nuevas dianas que intervengan en dicho proceso.

### **3. Vías de señalización de los supresores tumorales p53 y pRb como las vías centrales en la activación de senescencia.**

Las dos proteínas supresoras de tumores, p53 y pRb, juegan un papel crítico en la inducción de senescencia, ambas son necesarias para la inducción y el mantenimiento de la senescencia (42, 122). Aunque las dos rutas interaccionan entre sí (Figura 2), ambas pueden detener la progresión del ciclo celular independientemente, cada una responde a diferentes estímulos y la activación de una u otra es dependiente del tipo celular y de la especie.



**Figura 2 La senescencia controlada por las vías de p53 y pRb.** Algunas señales que inducen senescencia, como el daño en el ADN, activan la vía de p53 o la de pRb. Otras señales, como el oncogén *Ras*, activan ambas vías. p53 es regulado negativamente por la ubiquitina ligasa E3 HDM2 (en ratón MDM2) y ésta es regulada negativamente por ARF (p14 en humanos y p19 en ratón). La activación de p53 induce senescencia, en parte, por la inducción de la expresión de p21, un inhibidor de CDK, que entre otras actividades, inhibe la fosforilación de pRb y por tanto su inactivación. Las señales de senescencia que activan la ruta de pRb lo hacen a través del aumento de p16, otro inhibidor de CDKs que inhibe la fosforilación de pRb y su inactivación. pRb detiene la proliferación al suprimir la actividad de E2F, un factor de transcripción que activa la transcripción de los genes requeridos para la progresión del ciclo celular. E2F1 puede además detener la proliferación a través de la inducción de la expresión de ARF que activa la vía de p53. Por tanto, hay una regulación recíproca entre ambas vías que también ocurre en otros contextos celulares como el daño en el ADN.

### La vía de p53.

El supresor tumoral p53 es el principal guardián frente al cáncer ya que controla tanto la proliferación celular como la muerte celular. En el 50% de los tumores la proteína es inactiva debido a mutaciones en el gen. En el resto, la inactivación es indirecta a través de la unión de proteínas virales o como resultado de alteraciones en genes cuyos productos regulan la actividad de p53. Por ejemplo, la amplificación de genes que activan la degradación de p53 (*Hdm2*), o la delección de genes que favorecen la activación de p53 (*ARF*) (150).

La vía de p53 normalmente no está activada, sólo se activa cuando se produce estrés o daño en la célula. Esto ocurre con el fin de impedir la multiplicación de dicha célula o incluso de eliminarla si el daño es elevado. Hay diferentes estímulos que activan la ruta de p53: el daño en el ADN, el estrés oxidativo, la hipoxia, la activación oncogénica, el acortamiento telomérico, etc. Cada estímulo produce la activación de p53 a través de un mecanismo diferente, por ejemplo, mientras que la activación de p53 por daño en el ADN ocurre a través de la fosforilación de p53 en la serina 15, la activación de p53 por estimulación oncogénica no ocurre mediante fosforilación sino que depende de la proteína ARF (35). Incluso dentro de un mismo mecanismo de activación de p53, dependiendo del estímulo intervendrán diferentes activadores, por ejemplo, la proteína kinasa ATM interviene en la activación de p53 inducida por radiaciones ionizantes pero no en la inducida por radiaciones ultravioletas (19). De cualquier manera, el resultado final de los mecanismos de activación de p53 consiste en un incremento en sus niveles proteicos y un cambio cualitativo

que mejora su capacidad de modular la expresión génica y de alterar el fenotipo de la célula. Entre los mecanismos que modulan la actividad de p53 cabe destacar los siguientes (53):

- **Alteración en la vida media de p53.** La proteína p53 tiene una vida media muy corta, por lo que sus niveles basales son muy bajos. Esto se debe a la alta tasa de degradación proteolítica mediada por ubiquitinación. Mdm2 es la enzima encargada de la ubiquitinación de p53 y por tanto de su degradación (69). En células dañadas o sometidas a estrés la vida media de la proteína aumenta significativamente, este aumento se debe a la inhibición de la interacción entre Mdm2 y p53, que ocurre tanto si la activación de p53 es por daño en el ADN como por estimulación oncogénica. En el primer caso, la interacción se ve reducida por la fosforilación de p53 en el extremo N-terminal que dificulta la unión a Mdm2 (133) y en el segundo caso, el aumento de la proteína ARF secuestra a Mdm2 impidiendo su unión a p53 (75, 106).
- **Alteraciones que afectan a la actividad funcional de p53.** Además del incremento de los niveles de p53, su activación requiere de otras modificaciones post-transcripcionales que afectan a su función, a su homo- y hetero-oligomerización y a su capacidad de unión al ADN. Algunas de esas alteraciones son:
  - Fosforilación. p53 es fosforilado en numerosas serinas de los dominios N- y C-terminal resultando una proteína más estable y activa. Hay un gran número de kinasas y un par de fosfatasas implicadas en la fosforilación/defosforilación de p53 (107).
  - Acetilación. Se ha visto que p53 es acetilado por p300 en la región C-terminal en respuesta al daño en el ADN y que dicha acetilación activa la función de p53 de unión al ADN (59).
  - Modulación redox. El estado redox de p53 parece influir en su capacidad de unión al ADN y en su función como activador transcripcional.
- **Alteración en la localización intracelular de p53.** Para que p53 se una al ADN y active la transcripción es necesario que se localice en el núcleo, por eso el transporte intracelular de p53 es un mecanismo importante de regulación funcional. Se ha visto que parte de la influencia de Mdm2 sobre la proteólisis de p53 viene de su capacidad de aumentar el transporte de p53 al citoplasma donde éste es degradado (115).
- **Alteración de la actividad de p53 a través de la unión de diferentes proteínas.** Hay determinadas proteínas que al unirse a p53 alteran su actividad, como la proteína Ref-1 que aumenta su capacidad de unión al ADN.

La activación de p53 se traduce en un aumento de la transcripción de sus genes diana. Se han descrito más de doscientos genes que son controlados directamente por p53 (46), la

mayoría por activación transcripcional pero algunos por represión transcripcional. Estos genes se clasifican en 4 grupos según la respuesta fisiológica en la que intervengan (150):

- **Parada del ciclo celular.** Uno de los primeros efectos de la activación de p53 es el bloqueo de la progresión del ciclo celular. p53 estimula la expresión de p21<sup>waf1</sup>, un inhibidor de las Cdks, que inhibe la transición G1-S y G2-M. p53 también estimula la expresión de la proteína 14-3-3σ que secuestra el complejo ciclina-Cdk1 en el citoplasma ayudando a mantener el bloqueo en G2 (28). Otras proteínas que intervienen en esta función activada por p53 son Reprimo y Gadd45 (65). Dependiendo del estímulo de activación de p53, la parada del crecimiento puede ser reversible o irreversible, en este último caso denominada **senescencia**.
- **Apoptosis.** Algunas células en las que se activa p53 bajo determinados estímulos se activa la muerte celular programada. Se han descrito varios mediadores de esta función de p53. Entre ellos se encuentra la proteína Bax, un miembro de la familia proapoptótica Bcl-2, las proteínas Noxa y Puma, que como Bax están localizadas en la mitocondria, el receptor de TNF o las proteínas Fas y PIDD. p53 también causa apoptosis por estimulación directa de la mitocondria la cual produce un exceso de especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas.
- **Estabilidad genética.** La proteína p53 juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genética a través de la inducción de genes que regulan la reparación del ADN, la recombinación y la segregación cromosómica (152). Algunos de los genes implicados en esta respuesta son *p48* y *p53R2*.
- **Inhibición de la angiogénesis.** p53 estimula la expresión de genes que impiden la angiogénesis, como *PAI*, *BAI-1* o *Maspin*.

Algunos de los genes activados transcripcionalmente por p53 no intervienen en ninguna de estas 4 respuestas fisiológicas sino que van dirigidos a alterar la actividad de p53, es decir, forman parte de los **circuitos de retroalimentación** negativos y positivos de la vía de p53. Se han descrito 10 de estos circuitos, 7 negativos y 3 positivos (65). El circuito de retroalimentación negativo más conocido es el mediado por Mdm2, la activación de p53 induce un incremento de Mdm2, el cual restablece los niveles basales de p53 a través de su degradación.

Por las funciones que realiza p53 resulta una proteína muy importante en la supresión tumoral, de ahí que la mayoría de los tumores presenten inactivada su función bien por mutación de *p53* o por alteraciones en la vía. Por tanto, la recuperación de la actividad de p53 en dichos tumores podría proporcionar una terapia efectiva frente al

cáncer. Varios trabajos (93, 148, 157) muestran cómo el restablecimiento de la expresión de p53 en tumores de ratones deficientes en p53 lleva a una regresión de dichos tumores. Esta función anticancerígena del restablecimiento de la función de p53 ocurre de diferente manera según el tipo de tumor, por ejemplo, en linfomas se induce apoptosis (93, 148), pero en otros tipos de tumores sólidos, como sarcoma y carcinoma hepatocelular, se induce senescencia (148, 157). Ambos tipos de respuesta se asocian con regresión tumoral. Estos resultados refuerzan la posibilidad de utilizar la reactivación de p53 como estrategia terapéutica. El restablecimiento de la expresión de p53 en tumores que han perdido su expresión es difícil en la práctica, pero la restauración de la funcionalidad de la vía en tumores que mantienen p53 normal, por ejemplo en tumores con sobreexpresión de Mdm2 o ausencia de ARF, se ha explorado recientemente con éxito (50, 145).

### La vía de pRb.

El producto de expresión del gen de *retinoblastoma* (*Rb*), la proteína pRb, es un supresor tumoral crucial que se encuentra inactivado, directa o indirectamente, en casi todos los tumores humanos. Se observó que la pérdida de heterocigosidad de *Rb* contribuía a la formación de tumores en la retina humana denominados retinoblastomas (23). Además, se han encontrado mutaciones en *Rb* en un amplio rango de tumores. Sin embargo, también es muy frecuente la inactivación indirecta de la vía de pRb a través de la unión de proteínas virales o como resultado de alteraciones en genes cuyos productos regulan indirectamente la actividad de pRb. Por ejemplo, la amplificación de genes cuyos productos inhiben a pRb (*Ciclinas D*, *CDK4*), o la delección de genes cuyos productos activan a pRb (*p16<sup>INK4a</sup>*) (78).

pRb actúa como un cofactor transcripcional que se une y antagoniza o potencia la función de numerosos factores de transcripción (89). También actúa como una proteína adaptadora que recluta complejos remodeladores de cromatina que reprimen la expresión de determinados genes dianas (10). La principal función de pRb es impedir la entrada no programada en el ciclo celular. En ausencia de estímulos mitogénicos la actividad de pRb está dirigida a impedir la progresión del ciclo celular a través de la inhibición de los factores de transcripción E2F. La inhibición de E2F lleva a la represión de sus genes diana, entre los que se encuentran genes necesarios para la entrada en la fase S y genes que retroactivan la inhibición de pRb a través de la promoción de la hiperfosforilación de pRb (100). Los mitógenos revierten la inhibición transcripcional de los promotores dependientes de E2F a través de la activación secuencial de los complejos ciclinas-Cdk los cuales fosforilan a pRb y atenúan su capacidad correpresora (62). pRb se mantiene hiperfosforilado hasta la mitosis, cuando se restaura su función a través de la defosforilación por la proteína fosfatasa 1 $\alpha$

(PP1 $\alpha$ ) (99, 118, 139). Sin embargo, la acción de pRb puede inducirse durante la progresión de un ciclo celular en respuesta a señales anti-mitogénicas. Este retorno de pRb a su estado activo hipofosforilado ocurre a través de la atenuación de la expresión de Ciclinas, de la inducción de inhibidores de Cdk's o de la modulación directa de pRb a través de fosfatasa's (43, 79).

pRb se une a numerosas proteínas y media la regulación transcripcional de cientos de genes diana. Estas proteínas de unión y estos genes diana median las numerosas funciones de pRb sobre proliferación celular, diferenciación, senescencia, estabilidad genómica, angiogénesis, metástasis y apoptosis. A continuación se describe el efecto de la pérdida de función de pRb sobre estos procesos:

- **Proliferación celular.** Es más probable que la pérdida de la función de pRb origine un tumor a partir de células progenitoras (células que proliferan activamente pero que no poseen capacidad de renovación como las células madre) que a partir de células diferenciadas. En estas células la pérdida de pRb podría provocar una salida precipitada de G1/S originando un desbalance en el ciclo celular y apoptosis.
- **Diferenciación.** La pérdida de pRb reduce el potencial de diferenciación. La presencia de pRb en las células tumorales podría promover su diferenciación y así restringiría su potencial proliferativo, esto explicaría porque en algunos tumores pRb se pierde durante la progresión de un tumor bien diferenciado a uno pobremente diferenciado. Es decir, la pérdida de pRb se correlaciona con tumores de alto grado de malignidad (124).
- **Senescencia.** La pérdida de pRb impide la inducción de senescencia y permite a la célula tumoral evadir este mecanismo de supresión tumoral. Además, como pRb participa en la formación de la heterocromatina en células senescentes, su ausencia podría producir una remodelación de la cromatina en las células diferenciadas permitiendo la expresión de genes del ciclo celular y resultando en la dediferenciación de las células (136).
- **Estabilidad genómica.** La pérdida de pRb resulta en inestabilidad cromosómica. Los tumores humanos muestran un alto grado de inestabilidad genómica, la pérdida de pRb podría participar en este fenotipo al perderse el punto de control de la fase M, por lo que se inducirían errores en la replicación del ADN y anomalías en la segregación cromosómica (45).
- **Angiogénesis.** La pérdida de pRb promueve la angiogénesis ya que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y otros factores angiogénicos son dianas transcripcionales de E2F (52).

- **Metástasis.** Se ha observado que la pérdida de función de pRb está asociada con el incremento del potencial metastático de determinados tumores (124). Esto se debe a que algunos genes diana de E2F poseen un papel potencial en la invasión y metástasis (161).
- **Apoptosis.** La pérdida de pRb va asociada a un aumento en la susceptibilidad a apoptosis (30). Este efecto se debe a que la actividad descontrolada de E2F lleva a un aumento de la expresión de genes proapoptóticos (74). Se ha descrito que la pérdida de pRb contribuye a la muerte celular mediada por p53 de forma dependiente al supresor tumoral ARF. La inducción de la expresión de E2F1 como resultado de la pérdida de pRb puede inducir la expresión de ARF (7, 162), activando la vía de p53 e induciendo apoptosis. También se ha observado que E2F1 puede inducir apoptosis de forma independiente a p53, por ejemplo, a través del homólogo de p53, p73 (72). Este efecto de pRb parece paradójico en relación a su papel de supresor tumoral, de hecho, la ausencia de pRb podría aumentar la apoptosis mediada por E2F en respuesta al daño en el ADN y favorecer así la eliminación de las células tumorales. Esto podría explicar porque la mayoría de tumores sólo muestran alteraciones de pRb en estados tardíos de la progresión tumoral y porque los pacientes con retinoblastoma no muestran alta predisposición a desarrollar otro tipo de tumores. Sin embargo, si las células tumorales antes de perder pRb portasen una mutación que las hiciera resistentes a apoptosis, como la mutación en *p53*, las células tumorales se beneficiarían de la pérdida del resto de funciones supresoras tumorales de pRb y el tumor progresaría.

Muchas de las consecuencias de la inactivación de pRb están ligadas a un aumento en el potencial tumorigénico de las células, sin embargo, la pérdida de pRb puede también aumentar la muerte celular, lo que no resulta beneficioso para las células tumorales. Queda mucho por entender sobre la importancia relativa de cada una de estas funciones en el papel de pRb como supresor tumoral. La respuesta celular de la presencia o ausencia de pRb puede depender de vías regulatorias más complejas que todavía no se conocen bien. Es necesario un mejor entendimiento de estas vías, y de todos los reguladores de la actividad de pRb para poder diseñar terapias dirigidas a tumores deficientes en pRb.

#### 4. Rastreo genético por pérdida de función como herramienta para encontrar nuevos genes supresores de tumores.

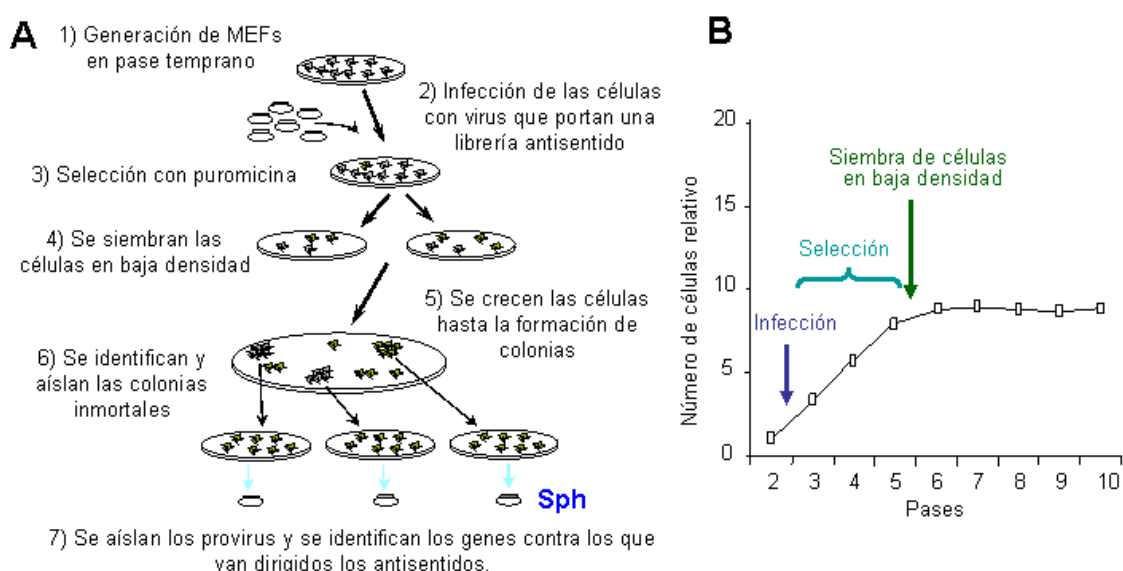
El proceso de senescencia es un mecanismo supresor de tumores. Así, el conocimiento de las vías de señalización que controlan este proceso permitiría la actuación farmacológica



en dichas vías con el fin de bloquear el crecimiento de tumores. Por este motivo, realizamos un rastreo genético por pérdida de función utilizando una librería de ADNc en antisentido para identificar genes críticos en la senescencia replicativa y en la inmortalización celular que podrían actuar como supresores de tumores (81). Para evitar posibles complicaciones con el fenotipo de crisis realizamos el rastreo en MEFs, puesto que este tipo celular constituía un modelo *in vitro* excelente para nuestro propósito.

Se generó una librería de fragmentos antisentido al azar a partir de ARN polyA total, estos fragmentos se clonaron en un vector retroviral pMARXIVpuro (20). Se infectaron MEFs CD1 presenescentes creciendo exponencialmente con retrovirus que portaban la librería. Tras la selección se sembraron  $10^5$  células por placa de 10cm en pase 6 (en el límite de la senescencia replicativa en MEFs). Las colonias que superaron la parada de crecimiento de senescencia fueron aisladas y se extrajo su ADN genómico. Los provirus independientes que portaban un fragmento antisentido individual se aislaron y se testaron de nuevo mediante la reinfección de MEFs presenescentes, los fragmentos que evadieron la senescencia fueron seleccionados y se identificaron los genes contra los que iban dirigidos dichos antisentidos (Figura 3).

Se identificaron seis fragmentos antisentido dirigidos a proteínas de diferentes propiedades bioquímicas (81). Entre ellos, se identificó el antisentido frente a Espinofilina (Sph) que se recuperó cuatro veces independientes y que tenía un tamaño de 104 nucleótidos.



**Figura 3 Rastreo genético realizado para encontrar nuevos genes supresores tumorales involucrados en el proceso de senescencia e inmortalización celular. (A)** Esquema experimental seguido en la identificación de genes que controlan el proceso de senescencia replicativa en MEFs. **(B)** Curva de Hayflick que muestra la evolución de un cultivo de MEFs y el momento en el que se realizaron algunas etapas del esquema experimental del rastreo genético.



## 5. Espinofilina.

Espinofilina (Sph), también denominada Ppp1r9b, es una subunidad reguladora de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 isoforma  $\alpha$  (Ppp1ca) que se expresa en muchos tejidos pero principalmente en el sistema nervioso central, en las espinas dendríticas, que son ramificaciones especializadas de las dendritas en las cuales se reciben la mayoría de los impulsos excitatorios del sistema nervioso central.

Sph fue identificada por Allen et al. (1) al utilizar un ensayo de doble híbrido para identificar subunidades reguladoras de PP1 $\alpha$  a partir de una librería de ADNc de cerebro de rata. Identificó un gen (Ppp1r9b) que codificaba una proteína de 817 aminoácidos y que denominó Espinofilina por su localización en las espinas dendríticas. El peso molecular teórico de dicha proteína era de 89.5 kDa aunque el peso molecular observado en electroforesis SDS-PAGE era de aproximadamente 130 kDa. Posteriormente, Satoh et al. (127) identificaron a Sph como una proteína de unión a F-actina y la denominaron Neurabina 2 por su similitud con la proteína Neurabina 1. Finalmente, Vivo et al. (149) en un ensayo de doble híbrido para identificar proteínas humanas que interaccionaran con el supresor tumoral p14<sup>ARF</sup> en el que utilizaron una librería de ADNc de cerebro humano, identificaron el gen de Sph (PPP1R9B localizado en el cromosoma 17, 17q21.33) y reconstruyeron su ADNc completo que codificaba una proteína de 817 aminoácidos que compartía el 95% de identidad con su homólogo de rata.

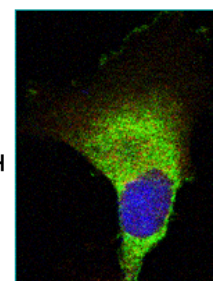
Para analizar el papel de Sph en la función y formación de las espinas dendríticas Feng et al. (48) generaron el ratón Knock-out (KO) para Sph en el que sustituyeron el exón 1 del gen (Ppp1r9b) por un casete de resistencia a neomicina. El ratón KO que no expresaba la proteína Sph de 817 aminoácidos presentaba un mayor número de espinas dendríticas, una neurotransmisión glutaminérgica alterada y una pérdida de la susceptibilidad a la apoptosis neuronal, lo que demostraba el papel de Sph en la modulación de la transmisión sináptica glutaminérgica y en la morfología dendrítica.

Sph es una proteína de anclaje, la función de este tipo de proteínas consiste en reclutar diferentes proteínas a las diferentes vías de señalización celular y posicionarlas cerca de sus sustratos fisiológicos. Para ejercer esta función Sph cuenta con diferentes dominios de unión a proteínas (126) (Figura 4): presenta dos dominios de unión a actina (ActinBD1 y ActinBD2) en el extremo N-terminal (localizados entre los aminoácidos (aa) 1-154 y 164-282 respectivamente), un dominio SH3 de unión a proteínas (SH3BD) formado por tres regiones ricas en prolinas en el extremo N-terminal (localizadas entre los aa 8-14, 137-143 y 281-287), un dominio de unión a receptores transmembrana de 7 dominios a través del tercer

dominio intracelular 3i (ReceptorBD) (localizado entre los aa 151-444), un dominio de unión a PP1 (PP1BD) (localizado entre los aa 417-494), un motivo de estructura  $\alpha$ -helicoidal que forma dominios coiled-coil (LIZ) (localizado entre los aa 485-510), un dominio PSD95/DLG/zo-1 (PDZ) (localizado entre los aa 492-583) de unión a los extremos C-terminales de determinadas proteínas, especialmente proteínas integrales de membrana que terminan en valina, y un dominio coiled-coil en el extremo C-terminal (localizado entre los aa 664-814) a través del cual puede unirse a otras proteínas o a otras moléculas de Sph formando homodímeros.

Sph contiene secuencias consenso de fosforilación (Figura 4) por varias proteínas kinasas (PK) (126). La PK dependiente de AMPc (PKA) fosforila a Sph en las serinas 94 y 177, la PKII dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaMKII) la fosforila en las serinas 100 y 116, la PK5 dependiente de ciclina (Cdk5) la fosforila en la serina 17 y la PK regulada por señales extracelulares (ERK) la fosforila en la serina 15 y 205. Se ha visto que la fosforilación de Sph regula su unión a diferentes proteínas (51, 71, 138).

La localización de Sph es principalmente citoplásmica y de membrana (Figura 4). Varios autores han observado la localización de Sph en la superficie celular, se ha visto localizada en los sitios de adhesión célula-célula colocalizando con la proteína de adhesión E-caderina (127) y se ha demostrado un aumento de la redistribución de Sph hacia la membrana tras la estimulación agonista adrenérgica (15). También se ha observado la colocalización de Sph con el citoesqueleto de actina tanto en citoplasma como en membrana (5, 138). Hay un único trabajo que sugiere la posibilidad de que Sph presente además localización nuclear y señala la región comprendida entre los aminoácidos 552-813 como la necesaria para dicha localización (149), sin embargo, ninguno de los demás trabajos de estudio de localización de Sph muestra dicha localización nuclear, abundando en su localización citoplásmica y de membrana (5).



**Figura 4 Estructura y localización de la proteína Sph.** Se muestra un esquema en el que se especifican los dominios de unión a otras proteínas que componen la proteína y las secuencias consenso de fosforilación por varias proteínas kinasas. Dominios ActinBD1 y 2: dominios de unión a actina (actin binding domain), SH3BD: dominio SH3 de unión a proteínas, ReceptorBD: dominio de unión a receptores transmembrana, PP1BD: dominio de unión a PP1, LIZ: motivo de estructura  $\alpha$ -helicoidal que forma dominios coiled coil, dominio PDZ y dominio coiled coil. También se muestra una foto de microscopía confocal de una célula que sobreexpresa Sph unido a un dominio HA.

Sph es una proteína multifuncional que a través de su unión a numerosas proteínas (tabla 1) regula el citoesqueleto y la transducción de señales (126). Sph regula el citoesqueleto a través de su unión a proteínas como F-actina, regula la actividad de determinadas enzimas como PP1 $\alpha$  facilitando su unión al sustrato y su actividad, regula la actividad de determinados GEFs y RGS y por tanto la señalización de las proteínas G, regula la señalización de determinados receptores de membrana como los glutaminérgicos y por tanto la neurotransmisión glutaminérgica, regula el estado de fosforilación y la función de determinados canales iónicos y parece intervenir en el proceso de supresión del crecimiento a través de su unión a ARF.

Grupo de proteínas	Proteína	Dominio de unión de Sph	Referencias
Proteínas del citoesqueleto y de adhesión celular	F-actina	ActinBD 1 y 2	(5, 58, 127)
	Neurabina 1	Coiled-coil	(90)
	Espinofilina	Coiled-coil	(127)
	Doublecortina	Coiled-coil	(9, 143, 144)
	DCAMKL1	Coiled-coil	(143)
	Caderina- E	Colocalización	(123, 127)
Enzimas	PP1 $\alpha$ / PP1 $\gamma$ 1	PP1BD	(1, 70, 90, 141)
	I2 / I4	-	(142)
	p70 <sup>S6K</sup>	PDZ	(17)
Factores de intercambio de guanina (GEF) y reguladores de las proteínas G de señalización (RGS)	Tiam1	aminoácidos 444-817	(17)
	Ras-GRF1	aminoácidos 444-818	(17)
	Kalirin-7	C-terminal	(105)
	Lfc	Coiled-coil	(120)
	Asef2	Coiled-coil	(121)
	RGS1,2,4 y16	-	(155)
	GAIP	-	(155)
Receptores de membrana	R. dopaminérgico D2	ReceptorBD	(137)
	R. adrenérgicos $\alpha$ 1b,2a,2b y 2c	ReceptorBD	(112, 153)
	R. glutaminérgico AMPA	Colocalización	(158)
Canales iónicos	RYR1 y 2	LIZ	(94)
	TRPC5 y 6	-	(55)
Otras	TGN38	Coiled-coil	(138)
	ARF	aminoácidos 605-726	(149)

**Tabla 1** Tabla resumen de las proteínas de unión a Sph. Se muestra el tipo de proteínas que son, el nombre de la proteína y el dominio a través del cual se unen a Sph(126).

Nosotros hemos identificado a *sph* como un gen cuya ausencia evade la senescencia replicativa y que por tanto podría comportarse como un supresor tumoral. Determinada información extraída de diferentes publicaciones podría relacionar a Sph con el proceso de senescencia y con la supresión tumoral.

Por un lado, se sabe que Sph es una subunidad reguladora de la proteína fosfata 1 (PP1). PP1 es una Ser/Thr fosfatasa que se compone de una subunidad catalítica (Ppp1c), de las que hay 4 isoformas, la  $\alpha$ , la  $\beta$ , la  $\gamma$ 1 y la  $\gamma$ 2, y una subunidad reguladora, de las que

se han descrito más de 50. Sph se une preferentemente a las subunidades catalíticas Ppp1 $\alpha$  y Ppp1 $\gamma$ 1 (1). Las subunidades reguladoras inhiben, modulan, o dirigen a la subunidad catalítica a determinadas estructuras subcelulares o sustratos. Inicialmente se mostró que Sph inhibía a Ppp1c *in vitro* (1), posteriormente se propuso que Sph, al dirigir a Ppp1c a su sustrato, facilitaba la defosforilación de dichos sustratos (158). PP1 $\alpha$  es la enzima que cataliza la defosforilación de pRb (87, 99, 117) por lo que posee un papel crucial en el control del crecimiento, de hecho, la activación constitutiva de la enzima a través de la mutación que impide la fosforilación de PP1 $\alpha$ , causa parada de crecimiento en G1 dependiente de pRb en células tumorales humanas (8). Además, se sabe que PP1 $\alpha$  contribuye a la senescencia inducida por Ras. El oncogén *Ras*, a través del aumento de los niveles de ceramidas, incrementa la actividad de Ppp1c $\alpha$  manteniendo a pRb en su estado hipofosforilado induciendo así senescencia y contribuyendo a la supresión tumoral (22). Además, se ha descrito que Ppp1c $\alpha$  colocaliza con pRb sólo durante senescencia y no durante parada del ciclo celular, lo que sugiere que la segunda señal que contribuye a la irreversibilidad del fenotipo senescente puede ser la activación de PP1 $\alpha$  (119). PP1 $\alpha$  no solo está relacionado con senescencia, también se ha relacionado con apoptosis. Se ha visto que la activación de Ras influye en la actividad catalítica de PP1 $\alpha$  lo que lleva a la defosforilación de Bad y consecuentemente a apoptosis (2) y que la apoptosis mediada por PP1 $\alpha$  va asociada a la defosforilación de pRb (154). Además, se ha propuesto que PP1 $\alpha$  puede actuar como un supresor tumoral ya que se han observado mutaciones frecuentes en la localización cromosómica del gen de *Ppp1c $\alpha$*  que han sido ligadas al desarrollo de algunos tipos de cáncer (4), se ha visto que su actividad previene la transformación oncogénica (22, 86) y que los niveles de su ARNm se encuentran reducidos en diferentes tipos de tumores (22).

Por otro lado, se ha descrito que Sph se une a la proteína doublecortina (DCX), la cual se postula como un supresor tumoral en gliomas. Se ha visto que Sph es un mediador imprescindible de la supresión del crecimiento independiente de anclaje producida por DCX, es decir, que la interacción entre DCX y Sph puede contribuir a reducir la tumorigenicidad del glioma (125).

Finalmente, se ha descrito que Sph se une al supresor tumoral p14<sup>ARF</sup> y que ambas proteínas tienen un efecto aditivo en la supresión del crecimiento. Además, se ha observado que Sph tiene un papel en la supresión de la formación de colonias independiente de p53, ARF y pRb (149).

De acuerdo a nuestros datos del rastreo genético en el que se identificó a Sph y a los datos bibliográficos, decidimos analizar en profundidad el papel de Sph en los procesos de

senescencia e immortalización celular y estudiar el mecanismo molecular a través del cual Sph puede intervenir en estos procesos, centrándonos en las vías de los supresores tumorales pRb y p53 por ser las principales vías de regulación de dichos procesos y por la posible relación de Sph con dichas vías por su relación descrita con PP1 $\alpha$  y ARF. También quisimos estudiar el posible comportamiento del gen de *sph* como gen supresor de tumores *in vivo*.



## Objetivos

---





1. Estudiar el mecanismo molecular a través del cual Sph podría estar relacionada con el proceso tumoral.
2. Estudiar el efecto biológico de la ausencia de Sph en células de mamífero.
3. Estudiar el efecto biológico de la ausencia de Sph en modelos murinos.
4. Estudiar la relevancia de Sph en tumores humanos.



## **Materialles y métodos**

---



## 1. Reactivos biológicos usados.

**Antibióticos:** puromicina (Calbiochem), blastidina (Calbiochem), higromicina (Calbiochem), G418 (Gibco), zeocina (Invitrogen), ampicilina (Sigma).

**Tratamientos:** Etopósido (Sigma), 3-metil-colantreno (Sigma), peróxido de hidrógeno (Sigma), UCN01, DMBA (Sigma).

**Vectores utilizados:** pMARXIVpuro (vector retroviral con resistencia a puromicina), pMARXIV- $\alpha$ Sph (antisentido frente a *sph*: ACAGGGCCGGGGTGGTATGTGGAAGTGGCAAGAGATGGATTCTGAAAGGGGAGGGTACCTGAGGGGTTCTCACCTCCCTTGGTCCAAGCCATCCTGACTGACTG clonado en el vector retroviral pMARXIV), pBabepuro (vector retroviral con resistencia a puromicina), pBabepuro-*sph*-HA (extremo c-terminal de *sph* (aminoácidos 296-817) en fase con el dominio etiqueta HA clonado en el vector retroviral pBabepuro), pBabepuro-*ras*<sup>v12</sup> (oncogén *ras*<sup>v12</sup> clonado en el vector retroviral pBabepuro), pBabepuro-E1A*ras* (oncogenes *ras*<sup>v12</sup> y *E1A* clonados en el vector retroviral pBabepuro), pBabepuro-*ppp1ca*Sp0 (ADNc completo de *ppp1ca* clonado en el vector retroviral pBabepuro (22)), pBabepurop53, mutante 175H o 273H, clonado en el vector retroviral pBabepuro), pRetroSuper (vector retroviral con resistencia a puromicina), pRetrosuper-shRNAsph 1 y 2 (shRNA frente a *sph* (1: GCCGAGTGCGGTTCA TGATTTCAAGAGAATCATGAACCGCACTCGGC y 2: GGAAGTCCAATTCTACTTATTCAA GAGATAAGTAGAATTGGAGTTCC) clonado en el vector retroviral pRetroSuper), pRetrosuper-shRNA*ppp1ca* (shRNA frente a *ppp1ca* clonado en el vector retroviral pRetroSuper (22)).

**Cepas bacterianas:** Todos los plásmidos utilizados en la tesis se propagaron en la cepa de *E.coli* TOP10 (Invitrogen) o Max Efficiency DH10B (Invitrogen). Se crecieron en un medio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l NaCl pH 7.0) a 37°C, con agitación, durante 16h.

## 2. Técnicas básicas de biología molecular.

### 2.1. Transformación de células electrocompetentes (electroporación).

Se descongelaron en hielo alícuotas de células electrocompetentes y se añadió una cantidad apropiada de ADN (habitualmente 2  $\mu$ l de una mezcla de ligación o unos 100 ng de plásmido purificado). La mezcla de bacterias y ADN se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (BioRad) previamente enfriada en hielo y se sometió a una diferencia de potencial de 2500V durante 5 ms, utilizando un equipo Multiporator (Eppendorf). Después de la transformación se añadió 1ml de medio SOC (20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) a temperatura ambiente y se transfirió la mezcla a un tubo de 1.5 ml para

incubar 1 h a 37°C. Después se extendió el cultivo en placas de LB-agar con el antibiótico de selección apropiado y se dejaron incubando a 37°C durante 16h. Las colonias obtenidas se analizaron mediante digestión del ADN del plásmido con enzimas de restricción. Las que contenían la construcción adecuada se conservaron a -80°C en forma de cultivo líquido en medio LB con 20% de glicerol.

## 2.2. Transformación de células quimiocompetentes.

A 100 µl de bacterias quimiocompetentes se les añadió una cantidad apropiada de ADN. La mezcla de bacterias y ADN se incubó durante 30 minutos en hielo y después se dio un choque de calor a 42° C en un baño de agua durante 45s. A continuación se mantuvieron las células en hielo durante 2 minutos y se añadieron 400 µl de medio SOC a temperatura ambiente. Se incubaron 1 h a 37° C. Después se extendió el cultivo en placas de LB-agar con el antibiótico de selección apropiado y se incubaron a 37°C durante 16h. Se procedió igual que en el apartado anterior para confirmar que las células habían introducido el plásmido adecuado.

## 2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se realizó mediante un procedimiento estándar. Se preparó una mezcla que contenía 0.2 mM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada uno de los iniciadores, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de polimerasa Taq y la cantidad adecuada de ADN molde, todo ello diluido en el tampón de reacción suministrado por el proveedor de la enzima. Las reacciones se realizaron en termocicladores Biometra T3. Las condiciones de reacción fueron específicas para cada caso, pero se siguió un programa estándar: 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 95°C, 2 minutos a 55°C, 2 minutos a 72°C) y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

## 2.4. Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa.

El ADN (producto de PCR o fragmento de restricción) se separó en un gel de agarosa de la concentración apropiada (1-2%) con bromuro de etidio (Sigma). Las bandas de interés se cortaron del gel con un bisturí estéril, visualizándolo a través de un transiluminador de luz ultravioleta. La extracción del ADN se realizó mediante el sistema QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en la adsorción selectiva del ADN a una membrana de gel de sílice en presencia de una alta concentración de sales (la presencia de una sal caotrópica, el tiocianato de guanidinio, facilita además la solubilización de la agarosa). Después de un lavado el ADN se eluyó en un tampón de baja concentración de sales a pH ligeramente básico (Tris pH 8.5).

## 2.5. Clonaje de productos de PCR.

Los productos de PCR se clonaron en pGEM-T Easy Vector (Promega). Este vector posee extremos protuberantes 3' con un residuo desoxitimidina que permite la ligación directa de fragmentos con desoxiadenosinas 3' protuberantes como los generados por la polimerasa Taq.

Las reacciones se realizaron en un volumen de 10 µl que contenía: 5 µl del tampón de reacción de la enzima (2X), 1 µl de vector pGEM-T Easy Vector (50 ng), 1 µl de ADN ligasa T4, 2 µl del producto de PCR de interés y 1 µl de agua destilada. Esta mezcla se incubó durante 1h a temperatura ambiente y se transformó en células quimio o electrocompetentes. El ADN plasmídico se extrajo mediante el protocolo descrito en el apartado 2.8 y se analizó mediante digestión con enzimas de restricción y/o se secuenció para verificar su identidad.

## 2.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Se preparó una mezcla que contiene 1-5 µg de ADN, 2 unidades de enzima por microgramo de ADN y el tampón apropiado para la enzima, diluido a una concentración 1X en agua destilada, en un volumen total de 20-60 µl. La mezcla se incubó de 1 a 4 h a 37°C y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa. En los casos en los que los fragmentos de restricción debían utilizarse en una ligación posterior, el ADN se purificó a partir del gel tal como se ha descrito en el apartado 2.4.

## 2.7. Ligación.

Las reacciones de ligación se prepararon mezclando, en hielo, los fragmentos de restricción purificados (hasta un volumen de 7 µl), 1 µl de ADN ligasa de T4 (Invitrogen) y 2 µl del tampón de reacción de la enzima (5X). La mezcla se incubó a 16°C durante 12-16 h y se transformó en células electro o quimiocompetentes. Habitualmente, para ligaciones de extremos cohesivos, se utilizó una relación molar vector/inserto 1:3 y con extremos romos, de 1:6.

## 2.8. Extracción de ADN plasmídico.

La extracción de ADN se puede realizar a partir de pequeños o grandes volúmenes, según la cantidad que necesitemos. El protocolo se basa en ambos casos en una lisis alcalina seguida de la precipitación y purificación del ADN en una columna de intercambio iónico (sílice-dietilaminoetanol). El ADN se une a la columna en condiciones apropiadas de pH y baja concentración de sales, los contaminantes se eliminan en un lavado con tampón de fuerza iónica intermedia y el ADN se eluye en un tampón de alta concentración de sales. Por último, el ADN se precipita con isopropanol para concentrarlo y eliminar sales. En

ambos casos utilizamos el Plasmid kit de Qiagen para mini, midi o maxi, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Describimos el protocolo brevemente a continuación. Se creció el cultivo líquido en medio selectivo (LB con el antibiótico apropiado según el plásmido) durante 12-16 h a 37°C, con agitación. El volumen de cultivo dependería de si era una maxi, midi o mini (500, 200 y 10 ml, respectivamente). Las células se recuperaron por centrifugación (si era una maxi todas las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Avanti J-25 de Beckman) durante 30 minutos y se resuspendieron en la solución de resuspensión (Tris HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasa A 100 µg/ml). Después se añadió la solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%), mezclando por inversión e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó al añadir acetato potásico 3 M pH 5.5, mezclando inmediatamente. Después se centrifugó durante 30 minutos y el sobrenadante se echó en una columna previamente equilibrada, dejándolo caer por gravedad. Después, la columna se lavó dos veces con tampón de lavado (NaCl 1 M, MOPS 50 mM pH 7.0, 15% isopropanol) y el ADN se eluyó con tampón de elución (NaCl 1.25 M, MOPS 50 mM pH 8.5, 15% isopropanol). Finalmente el ADN se precipitó por adición de isopropanol a temperatura ambiente y centrifugación durante 30 minutos. Se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada.

### 3. Cultivos celulares.

#### 3.1. Líneas celulares.

En la Tabla 2 se recogen las características de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo, incluyendo el medio de cultivo, el origen y el tipo celular que representan.

Línea celular	Especie	Tipo celular	Medio de cultivo	Crecimiento	Origen
<b>MEFs wt</b>	Ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM+10% FBS	Adherentes	Nuestro Lab
<b>MEFsSph+/-</b>	Ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM+10% FBS	Adherentes	Nuestro Lab
<b>MEFs Sph-/-</b>	Ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM+10% FBS	Adherentes	Nuestro Lab
<b>MEFs p53-/-</b>	Ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM+10% FBS	Adherentes	Nuestro Lab
<b>MEFsp21-/-</b>	Ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM+10% FBS	Adherentes	Nuestro Lab
<b>NIH3T3</b>	Ratón	Fibroblastos inmortalizados	DMEM+10% FBS	Adherentes	ATCC
<b>Phoenix-A</b>	Humano	HEK293T que expresan los genes retrovirales <i>gag-pol</i> y <i>env</i> (anfotrópico)	DMEM+10% FBS	Adherentes	ATCC
<b>Linx-E</b>	Humano	HEK293T que expresan los genes retrovirales <i>gag-pol</i> y <i>env</i> (ecotrópico)	DMEM+10% FBS	Adherentes	D.Beach
<b>SAOS 2</b>	Humana	Sarcoma	DMEM+10% FBS	Adherentes	ATCC
<b>H1299</b>	Humana	Carcinoma de pulmón	DMEM+10% FBS	Adherentes	Dr. Silva
<b>HBL100</b>	Humana	Epitelio mamario transformada con antígeno T (SV40)	DMEM+10% FBS	Adherentes	ATCC
<b>MCF7</b>	Humana	Adenocarcinoma mamario	DMEM+10% FBS	Adherentes	ATCC
<b>MDA231</b>	Humana	Adenocarcinoma mamario	DMEM+10% FBS	Adherentes	ATCC
<b>U2OS</b>	Humana	Osteosarcoma	DMEM+ 10% FBS	Adherentes	ATCC

**Tabla 2. Características de las líneas celulares utilizadas.** ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.



### 3.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares.

Todas las líneas se cultivaron en medio DMEM suplementado con glutamina (Sigma/Gibco), 10% de suero fetal bovino (FBS; Sigma), 40 u/ml de penicilina, 40 µg/ml de estreptomicina y 1 µg/ml de fungizona (anfotericina B; Gibco/Invitrogen), lo que denominamos medio completo. Las células se crecieron en placas de 10 cm (Falcon) y se subcultivaron 1:4 -1:6 cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA (Sigma). Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> (Nuaire/Thermo). Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar de Clase II Bio-II-A (nivel de seguridad biológica 2; Telstar).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml, en su medio de cultivo normal o FBS, con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para descongelar un vial, se sumergió en un baño de agua a 37°C durante 2 minutos; se centrifugó el contenido en 5 ml de medio con suero y las células se resuspendieron en su medio de cultivo habitual.

### 3.3. Generación de MEFs.

Los MEFs se generaron a partir de embriones de ratones de 13.5 días. Se sacrificó a la hembra preñada a los 13.5 días de dar tapón, y se extrajo el útero con todos los embriones en su interior. A partir de este momento se trabajó en esterilidad, en campana de flujo laminar. Se procedió a la separación de cada uno de los embriones, los cuales, tras retirar los órganos diferenciados (cabeza y tejidos rojos), se recogieron individualmente en placas de 10cm donde se disgregaron con un bisturí estéril. Después se añadieron unas gotas de tripsina sobre el embrión y se dejó actuar durante 10 min en el incubador a 37°C. Posteriormente, se añadieron 10ml de medio completo, con ayuda de la pipeta se terminó con la disgregación mecánicamente y se pasó todo el volumen con las células disgregadas a placas de 25cm. A los 3 días, una vez las placas se habían llenado, se congelaron 10 viales de MEFs en pase 1.

### 3.4. Transfección de células.

**Transfección por precipitación con fosfato cálcico:** la mezcla de CaCl<sub>2</sub>, ADN y tampón fosfato origina la precipitación de pequeñas partículas insolubles de fosfato cálcico que contienen el ADN condensado (56). Estos complejos se adhieren a la membrana plasmática y entran en la célula por fagocitosis.

Las células se sembraron el día anterior a la transfección de manera que estuvieran a una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección. Entre 2 y 4 h antes de la transfección se cambió el medio a las células, añadiendo 10 ml de medio fresco completo (para una placa de 10 cm). En un tubo de 15 ml se mezclaron 20-30 µg del ADN correspondiente, 80 µl de CaCl<sub>2</sub> y se llevó a 500 µl con agua Milli-Q estéril. A esto se le

añadieron 500 µl de tampón HBS 2X (NaCl 270 mM, HEPES 55 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM, pH 7.0) gota a gota mientras se producían burbujas con una pipeta. Se dejó la mezcla durante media hora para permitir que se formasen los cristales de fosfato cálcico y se añadió sobre el cultivo celular gota a gota. Se dejaron durante 8-16h a 37°C y se les cambió el medio. Se dejaron incubar otras 48 h a 37°C para utilizarlas según procediera en cada caso.

**Transfección mediante el kit comercial Effectene** (Quiagen): la transfección con este kit se basa en la utilización de un potenciador de la condensación del ADN y de la utilización del reactivo Effectene, un reactivo lipídico no liposomal que cubre el ADN condensado con lípidos catiónicos. Este método proporciona una forma eficiente de transferir el ADN dentro de células eucariotas. El procedimiento se basa en dos pasos, el primero consiste en mezclar el ADN con el potenciador de la condensación del ADN y un tampón que proporciona las condiciones de sal óptimas para la condensación del ADN. Este paso requiere de 2-5 min. El segundo paso consiste en añadir el reactivo Effectene e incubar la mezcla durante 5-10 min para permitir la formación de los complejos Effectene-ADN. Posteriormente los complejos se mezclan con medio completo y se añaden directamente sobre las células, las cuales se dejaron incubar 24-48 h a 37°C para utilizarlas después según procediera en cada caso. La cantidad utilizada de cada reactivo dependió del tipo de placa de cultivo utilizada, se siguieron las instrucciones del fabricante.

### 3.5. Selección de células transfectadas o infectadas.

Tras 48 h de incubación se amplió 1:2 y se comenzó la selección con el antibiótico apropiado, manteniéndolo durante el tiempo necesario (que vendrá dado por la muerte de las células control sin transfectar). Posteriormente, se aislaron clones individuales o poblaciones celulares. Una vez seleccionadas, para el mantenimiento se puede reducir la concentración del antibiótico a la mitad.

### 3.6. Infección retroviral.

Se sembraron células LinX-E o Phoenix-A según el tropismo deseado (ratón o humano respectivamente). Las partículas retrovirales se produjeron por transfección transitoria de las células anteriores con el vector retroviral de interés, mediante el protocolo del fosfato cálcico (descrito en el apartado 3.4). Tras 8-16h de incubación a 37°C, se le cambió el medio a las células (10ml) y se dejaron 48 h a 32°C. Después, el sobrenadante que contenía los virus se pasó por un filtro de acetato de celulosa (0.45 µm, Millipore) y se suplementó con 8 µg/ml de polibreno (un policatión que reduce la repulsión electrostática entre el virus y la membrana celular; Sigma) y un volumen igual de medio fresco. Para la infección, el medio de cultivo de las células receptoras se reemplazó por medio nuevo con el sobrenadante viral y las placas fueron centrifugadas (1 h, 1500 rpm) e incubadas a 32°C

durante 8 h. Después, se cambió el medio y se mantuvieron 48 h a 37°C, momento en el que se comenzó con la selección apropiada.

### 3.7. Generación de la librería de fragmentos antisentido de ratón y transducción de MEFs presenescentes.

El ARN total de fibroblastos de ratón en senescencia replicativa fue tratado con DNasa libre de RNasa (10 U/μg ADN) durante 30 min. a 37°C y se extrajo con fenol. El ARN se corrió en un gel de electroforesis al 4% de acrilamida-7M urea y el ARNm fue purificado. Para generar la librería se usaron alícuotas de 2μg de ARNm. Se sintetizaron fragmentos de ADNc amplificados al azar, se seleccionaron por tamaño (50-500nt) en una columna S-400 (Pharmacia) y se colocaron en los sitios EcoRI y XhoI del pMARXIV puro en la orientación antisentido (20)

Para generar los virus, se sembraron  $5 \times 10^6$  células LinXE en placas de 10cm y se incubaron 24h. Después, se transfectaron usando el método del fosfato cálcico con 20μg de la librería en plásmido retroviral. Se recogieron los virus y se realizó la infección de los MEFs en pase 2 (como se describe en el apartado 3.6). Después de seleccionar con 2μg/ml de puomicina, los MEFs en pase 5 fueron sembrados a baja densidad y se incubaron a 37°C durante 15 días. Las colonias formadas durante este periodo (que contenían fragmentos antisentidos capaces de evadir la entrada en senescencia replicativa) fueron seleccionadas y mantenidas de forma independiente.

### 3.8. Recuperación de provirus.

Se extrajo el ADN genómico de cada uno de los clones que evadieron la entrada en senescencia replicativa. Se trató con RNasa A (50μg/ml, 30min) y Proteinasa K (100μg/ml), se extrajo con fenol/cloroformo, y se precipitó con etanol. Para escindir los provirus, se digirieron 10 μg de ADN genómico con recombinasa CRE (concentración final de ADN de 0.1 μg/μl) durante 3 h a 37°C, se extrajo con fenol/cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió en 5 μl de agua. Alícuotas de 2-5 μg de ADN total fueron electroporadas con bacterias DH10B-lac-trfA y los provirus recuperados como plásmidos retrovirales funcionales a partir de las colonias bacterianas resistentes a zeocina.

## 4. Ensayos celulares.

### 4.1. Protocolo 3T3 para MEFs.

Se contaban las células cada 3 días y se ampliaban sembrando  $1 \times 10^6$  células vivas por placa de 10cm. En cada pase se recogía muestra de proteína y ARN. Durante la etapa senescente se cambiaba el medio a las células cada 3 días, hasta que aparecían clones

inmortales, los cuales se ampliaron, se congelaron y se recogió muestras de proteína y ARN.

#### 4.2. Actividad $\beta$ -Gal asociada a senescencia.

La actividad  $\beta$ -Galactosidasa asociada a senescencia (SA $\beta$ Gal) se midió como se ha descrito previamente (41), salvo porque las células se incubaron en 5-Bromo-4Cloro-Indolil- $\beta$ -D-Galactopiranosido (X-Gal) a pH 5.5 para aumentar la sensibilidad del ensayo en MEFs. Las células senescentes se fijaron con glutaraldehído 0.5%, se lavaron 2 veces con MgCl<sub>2</sub> 1mM en PBS, se tiñeron con la solución de tinción de X-Gal (41) durante 3h a 37°C, se lavaron con agua 2 veces y se guardaron a 4°C y en oscuridad hasta el análisis. El porcentaje de células que expresaban SA $\beta$ Gal se cuantificó al microscopio examinando 200 células por placa de 10cm.

#### 4.3. Tratamientos de MEFs.

Se sembraban  $1 \times 10^6$  de células por placa de 10cm, 24h después, cuando las células alcanzaban una confluencia de 70-80% fueron tratadas con los siguientes fármacos:

Etopósido (100 $\mu$ M) durante 2, 8, 12, 24 y 48h.

3-Metil-Colantreno (3MC) (10 $\mu$ M) durante 3, 6, 12, 24 y 48h.

UCN01 (50, 100 y 200nM) durante 8h.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50, 100, 200, 300, 450  $\mu$ M) durante 2h.

Inmediatamente después del tratamiento, se extrajo proteína total como se indica en el apartado 6.2.

#### 4.4. Ensayos de tumorigénesis.

**Ensayo de proliferación.** Se sembraron  $2 \times 10^4$  células en pocillos de 35mm por triplicado. A las 24 h (día 0) se fijaron las células del primer punto y cada 48 h se extrajo un punto de la curva y se cambió el medio al resto; las células se fijaron con glutaraldehído al 0.5% y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Después de lavar y dejar secar las placas, el cristal violeta se resolubilizó en ácido acético al 15% y se cuantificó el número relativo de células a 595 nm. Los valores se representaron refiriéndolos al día 0.

**Ensayo de recuperación del crecimiento tras la retirada de suero:** Se sembraron  $2 \times 10^4$  células en pocillos de 35mm por triplicado. A las 24 h se cambió el medio por medio sin suero y 24h después (día 0) se añadió de nuevo medio con suero y se fijaron las células del primer punto y cada 48 h se extrajo un punto de la curva y se cambió el medio al resto; las células se fijaron con glutaraldehído y se tiñeron con cristal violeta que se resolubilizó en ácido acético al 15% y se cuantificó el número relativo de células a 595 nm. Los valores se representaron refiriéndolos al día 0.

**Crecimiento en bajo suero.** Se sembraron  $4 \times 10^4$  células en pocillos de 35mm por triplicado. A las 24h se cambió el medio (día 0) y se añadió medio con 0.5% de FBS. Cada 48h se extrajo un punto de la curva; las células se fijaron con glutaraldehído y se tiñeron con cristal violeta. Después de lavar, se resolubilizó el cristal violeta con ácido acético al 15%. Cuantificamos a 595 nm el número relativo de células. Los resultados se expresaron como un porcentaje, donde el 100% corresponde al número de células del día 0.

**Clonabilidad.** Las células fueron sembradas a diferentes concentraciones (100, 500, 1000, 10000 células) en placas de 10 cm y cultivadas en condiciones estándar, o a 39 y 32°C en el caso de los MEFs con el alelo termosensible de p53. El medio se cambió dos veces a la semana y después de 10-15 días, se fijaron y tiñeron con cristal violeta. Después de lavar, se cuantificó el número de colonias.

**Densidad de saturación:** Se sembraron  $4 \times 10^4$  células por pocillo de 35mm por triplicado. Se cambió el medio cada 48h y se fijó una placa cuando las células alcanzan el 100% de confluencia y otra 7 días después. Se tiñó con cristal violeta y se midió la absorbancia a 595nm. El valor representado es el valor de la segunda placa respecto a la primera. Un valor igual a 1 indica que las células dejan de crecer cuando alcanzan el 100% de confluencia, inhiben su crecimiento por contacto. Y un valor mayor de 1 indica que las células siguen creciendo después de alcanzar el 100% de saturación.

**Crecimiento en agar blando.** Para medir el crecimiento independiente de anclaje se resuspendieron  $1 \times 10^5$  células en agarosa D-1 low EEO (Pronadisa) 1.4% con medio 10% de suero, por triplicado. Este medio con las células se echó encima de una base de medio completo con agar 2.8% previamente solidificado en pocillos de 35mm. Tras 24h, se añadió 2ml de medio completo a cada pocillo, que se cambió dos veces por semana. Tras un mes, se tomaron fotos con un microscopio de contraste de fase (Olympus), se tiñó con cristal violeta 0.05%, se contaron las colonias y se midió el tamaño de las mismas.

**Ensayo de migración.** Las células se cultivaron en medio completo en una cámara de 4 pocillos (Lab-Tek II chambered 1.5 coverglass sytem 155382 Nalge Nunc Internacional) hasta alcanzar una monocapa. En ese momento se generó una herida usando una punta de pipeta de 20µl. Se tomaron fotografías cada 10 minutos durante 12h, usando un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS-UV. Finalmente, se cuantificó el área de la herida sin cerrar a diferentes tiempos.

#### 4.5. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo con yoduro de propidio (IP), un agente intercalante que produce fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN que contiene cada célula.

La suspensión previamente tripsinizada de  $1 \times 10^6$  células se lavó dos veces con PBS, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se le eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de etanol al 70% frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), añadido lentamente con agitación suave. Esta suspensión se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos 30 minutos. A continuación se realizó un lavado con 10 ml de PBS centrifugando a 1000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron las células en 500  $\mu\text{l}$  de PBS. Se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de RNasa A (20 mg/ml; Roche) y 10  $\mu\text{l}$  de IP (1 mg/ml; Sigma) justo en el momento de pasar la muestra. Las células se analizaron con un citómetro analizador FACScalibur (BD Biosciences), utilizando los programas informáticos CellQuest Pro (BD Biosciences) para la adquisición de datos y ModFit LT 3.0. (Verita Software House, Inc) para la cuantificación de las fases del ciclo. Se adquirieron 10000 eventos por cada condición experimental y la fluorescencia con IP se detectó en el canal FL2.

### 5. Ensayos con ratones.

#### 5.1. Líneas de ratones utilizadas.

1. Línea KO para Espinofilina (Sph) (48)
2. Línea doble: KO para Sph y KO para p53 (Jackson)
3. Línea doble: KO para Sph y transgénica (T) para p53<sup>172R-H</sup> (84).
4. Línea doble: KO para Sph y transgénica (T) para myrAkt (11).

La línea KO para Sph se mantuvo y se cruzó en heterocigosidad para obtener los diferentes genotipos en la misma camada y así reducir la posible variabilidad genética.

#### 5.2. Genotipaje de las líneas utilizadas.

**Lisis de colas de ratón:** Se añadían 400  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (KCl 50mM,  $\text{MgCl}_2$  1.5mM, Tris-Cl (pH=8.3) 10mM, IGEPAL CA 630 0.45%, Tween 20 0.45%, Proteinasa K (Promega) 10mg/ml) a las colas de los ratones conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se incubaba toda la noche a  $55^{\circ}\text{C}$  en agitación (230rpm). Después, se incubaba 30min en un termo-bloque a  $95-100^{\circ}\text{C}$ , se centrifugaban los lisados y se utilizaban 4  $\mu\text{l}$  para realizar la PCR para obtener el genotipo.

**PCR para genotipar los ratones:** Se preparó la mezcla de reacción que contenía 0.2 mM de dNTPs, 0.4  $\mu\text{M}$  de cada uno de los iniciadores, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1U de polimerasa Taq y 4  $\mu\text{l}$  del lisado de cola de ratón, todo ello diluido en el tampón de reacción suministrado por el proveedor de la enzima. En la Tabla 3 se detallan los cebadores, los

programas seguidos y los productos de PCR obtenidos en cada una de las PCR realizadas para analizar las modificaciones genéticas de cada línea utilizada.

Línea	Cebador: Secuencia (5'-3')	Programa de termociclador	Bandas esperadas (pb)			
			+/+	+/-	-/-	T/-
Sph KO	GGAGACCACTCCCATTCCC	94°C 45s / 57°C 45s / 72°C 1m/ 35 Ciclos	500	500 / 750	750	
	GGCGTCAGATATAGACAGAGG					
	AGGTGAGATGACAGGAGATC					
p53KO	CTATCAGGACATAGCGTTGG	94°C 45s / 53°C 45s / 72°C 1m/ 35 Ciclos	-	565	565	
	TATACTCAGAGCCGGCCT	94°C 45s / 53°C 45s / 72°C 1m/ 35 Ciclos	450	450	-	
	TATACTCAGAGCCGGCCT					
	ACAGCGTGTTGGTACCTT					
p53 <sup>172R-H</sup> T	GCCTGAAAATGTCTCCTGGCTCAGAGG	94°C 30s / 60°C 30s / 72°C 2m/ 39 Ciclos	-			350
	AATGGACTCCGAATTGTGAACCTTGTCT					
myrAkt T	TGAATTGGCCGCTCGCGAATC	94°C 1m / 55°C 2m / 72°C 2m/ 34 Ciclos	-			200
	AAGTTGTTGAGTGGGGAC					

**Tabla 3. Características de las PCR utilizadas para el genotipaje de las diferentes líneas de ratón.**

### 5.3. Mantenimiento de las colonias experimentales.

Los ratones de las líneas 1, 2 y 4 se mantuvieron en un fondo genético puro C57BL/6J, y la línea 3 en un fondo genético mixto C57BL/6J X FVB. Se establecieron colonias de entre 15 y 30 ratones (según la línea) de cada genotipo, para ello se utilizaron cruces en heterocigosis y en homocigosis (cuando fue posible). Además se congeló esperma de machos de genotipo Sph (-/-) (línea 1), Sph(-/-);p53(+/-) (línea 2) y Sph(-/-); p53<sup>172R-H</sup>(T/-) (línea 3). Todos los ratones fueron mantenidos de acuerdo a las normas establecidas en el animalario del CNIO (basadas en lo estipulado en el Real Decreto 1201/2005) y se sacrificaron mediante inhalación de CO<sub>2</sub> cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, con el fin de evitar el sufrimiento del animal.

### 5.4. Ensayos carcinogénicos.

**Tratamiento con 3MC:** Se preparó una disolución del carcinógeno 3-Metil-Colantreno (3MC) en aceite de sésamo (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml. Para conseguir una completa disolución hubo que calentar a 100°C durante 1h y agitar vigorosamente. Se trataron ratones de entre 3 y 5 meses con una única dosis de 1mg de 3MC (100µl) por vía intramuscular (en la pata trasera derecha). Los ratones se examinaron una vez por semana y se sacrificaron cuando el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente 1cm de diámetro.

**Tratamiento con DMBA Oral:** Se preparó una disolución del carcinógeno 9,10-dimetil-1,2benzantraceno (DMBA) en aceite de algodón (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml, para conseguir una completa disolución hubo que calentar a 37°C y agitar



vigorosamente. Se trataron hembras vírgenes de 9 semanas con 5 dosis de 1mg de DMBA, una por semana, por vía oral mediante sonda nasogástrica (100µl de la disolución 10mg/ml). Se vigiló por palpación la aparición de tumor de mama y se sacrificó a los ratones cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 300mm<sup>2</sup> o cuando llegaron al punto final humanitario.

**Tratamiento con tintura de DMBA:** Se preparó una disolución del carcinógeno DMBA en acetona a una concentración de 5 mg/ml. Se trataron ratones de entre 7-10 días con una única dosis de DMBA de 0.5mg, que se depositó directamente sobre la piel del lomo. Se observó periódicamente a los ratones y se sacrificaron cuando se palparon tumores o llegaron al punto final humanitario.

### 5.5. Necropsia y análisis patológico.

Una vez sacrificados los animales, se realizó la necropsia completa y se recogieron muestras de determinados tejidos para realizar el análisis histológico y molecular. Hubo tejidos que se recogieron tanto si eran normales como si estaban alterados (órganos sexuales, bazo, páncreas, hígado, riñón, pulmón, timo, corazón y cerebro) y otros que se recogían solo en caso de que estuvieran alterados (piel, músculo, hueso, estómago, intestino, pituitaria y nódulos linfáticos). Las muestras se fijaron en formalina al 4% tamponada durante 24h. Tras un proceso de deshidratación con etanol a distintas concentraciones y xilol, se introdujeron en parafina a 65°C, obteniendo bloques de los que se hicieron cortes de 2 µm en microtomo automático que se tiñeron con hematoxilina y eosina y/o diferentes anticuerpos como se describe en el apartado de inmunohistoquímica 7.7. También se recogieron muestras de tejidos normales y tumorales que se congelaron en nieve carbónica y se mantuvieron a -80°C. Algunos de estos tejidos congelados se disgregaron y lisaron con solución de lisis celular para extracción de proteína como se describe en el apartado 7.2 y se utilizaron para analizar determinadas proteínas por WB. Las glándulas mamarias se recogieron en portaobjetos silinizados y se fijaron durante 24h en una solución de ácido acético glacial: ácido clorhídrico: etanol 100% en proporciones 1:3:6. Después, se rehidrataron con incubaciones sucesivas con etanol al 70% y agua, se tiñó con rojo carmín durante la noche y se hicieron fotos con un microscopio Olympus Provis AX70.

### 5.6. Análisis estadístico de los datos obtenidos de los ensayos con ratones.

Utilizamos el programa informático GraphPad PRISM para todos los análisis estadísticos. Para determinar la significación estadística de las curvas de crecimiento se utilizó un test Chi cuadrado. Para determinar la significación estadística de los porcentajes de alteraciones macroscópicas observadas en las necropsias se utilizó un test T de Student's one tailed. Para determinar la significación estadística de la clasificación de proliferación para las tinciones de rojo carmín de glándulas mamarias se utilizaron curvas de



una variable y un test T de Student's. Para determinar la significación estadística de la cuantificación de las lesiones benignas observadas en las tinciones de rojo carmín de las glándulas mamarias se utilizó un test T de Student's one tailed.

Valores de p menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), y  $p < 0.001$  (\*\*\*)

## 6. Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN.

### 6.1. Extracción de ARN total.

El ARN total de líneas celulares se purificó con la solución TRI-REAGENT (Molecular Research Center, Cincinnati Ohio) según las indicaciones del fabricante. A las células en monocapa, lavadas con PBS, se les añadió 1 ml del reactivo y utilizando un rascador, se extrajo el lisado celular y se echó en un tubo de 1.5 ml. Se homogenizó la muestra y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para la separación de las fases, se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo y se agitó vigorosamente. Tras la incubación de la muestra durante 2-15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 15 minutos a 12000 x g en frío. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se precipitó el ARN con 500  $\mu$ l isopropanol. Posteriormente se incubó 5-10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g 8 minutos en frío. Por último, se lavó con etanol al 70% y, tras otra centrifugación, se dejó secar al aire y se disolvió en 50  $\mu$ l de agua tratada con DEPC.

### 6.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

La síntesis de ADNc a partir de ARN total se realizó después del tratamiento con DNasa, para lo cual se incubó el ARN obtenido con 100  $\mu$ l de tampón de la enzima (2X; Tris HCl 20 mM,  $MgCl_2$  20 mM), 1  $\mu$ l de inhibidor de RNasas (40 U/ $\mu$ l; Roche) y 4  $\mu$ l de DNasa (10U/  $\mu$ l; Roche) a 37°C durante 20 minutos. Tras inactivar la DNasa a 4°C, se purificó el ARN libre de ADN mediante fenolización y se precipitó con etanol.

La transcripción reversa se realizó mezclando, en hielo, 5  $\mu$ g de ARN total y 0.5  $\mu$ l de cebadores de secuencia aleatoria (random primers; Promega). Esta mezcla se desnaturalizó a 70°C 10 minutos y se dejó de nuevo en hielo. Posteriormente se añadió 5  $\mu$ l del tampón de la transcriptasa inversa (5X), 2  $\mu$ l de dNTP (5 mM), 2  $\mu$ l de la enzima MMLV (Promega) y hasta 12  $\mu$ l de agua DEPC libre de RNasas. Se incubó la mezcla 1.5 h a 37°C. Tras parar la reacción a 70°C, 10 minutos, el ADNc estuvo preparado. Se conservó a -20°C.

La amplificación del ADNc se realizó como se describe en el apartado 2.3. En concreto para la amplificación de Sph, se utilizaron los siguientes cebadores:

cebador directo (5'-3')	cebador reverso (5'-3')
GGGTTTAATTTTGAGAGTGATTGT	TGGTATTTGTAATTTTATGGTTTGG
CAAACCTTTCCTACAAAACAACAAA	AAATAAATTTAATCATTTCCACCACA

### 6.3. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR).

**Pacientes.** Se utilizó tejido normal y tumoral de 15 pacientes con carcinoma de pulmón elegidos al azar del banco de tumores del Departamento de Patología del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona, España). Las muestras de biopsias se recogieron de forma rutinaria y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de su extracción. Todos los tumores fueron histológicamente examinados para confirmar el diagnóstico. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Vall d'Hebron.

**RT-PCR cuantitativa a tiempo real.** El ARN total fue extraído del tejido normal y tumoral con el mini kit RNAeasy (Qiagen, Hilden, Germany). El kit de ARN nano Lab Chip (Agilent, Palo Alto, CA) se utilizó para cuantificar y determinar la integridad del ARN total aislado. La síntesis del ADNc se realizó utilizando cebadores al azar con transcriptasa reversa SuperScript<sup>TM</sup> II (Invitrogen, Carlsbad, CA) y las alícuotas fueron guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para determinar la expresión de Sph se utilizó la tecnología RT-PCR cuantitativa a tiempo real. La cuantificación se hizo con un termociclador ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los datos fueron analizados con un software de detección de secuencias. El programa de PCR consistió en una desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y 50 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos; la hibridación y la polimeración se produjo a  $60^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto.

Los cebadores y la sonda para Sph fueron comprados de Taqman Applied Biosystems (Foster City, CA).

Para normalizar las variaciones en la cantidad de ADNc de muestras diferentes se utilizó la ciclofilina (ref. 4326316E), un control endógeno. Cada reacción se hizo por triplicado con ADNc de tejido normal y tumoral de cada paciente estudiado. Se introdujo en cada experimento una muestra de control negativo (sin ADNc). Y se realizó una extracción al azar de tejido original de algunas muestras para confirmar que se obtenían resultados reproducibles de cada PCR cuantitativa a tiempo real (datos no mostrados).

### 6.4. Hibridación de una matriz de ARN.

Prehibridamos las membranas con las matrices de muestras pareadas de ARN de tejido sano y tumoral de diversos pacientes (Cancer Profiling Array, BD Biosciences) con la solución de hibridación ExpressHyb durante 4h a  $65^{\circ}\text{C}$ . La sonda apropiada (ADNc completo de Sph) fue marcada mediante PCR con redivue dCTP32 (Amersham). Después, la sonda fue purificada para eliminar nucleótidos radiactivos libres con una columna NickTN G-50 de sefarosa (Amersham) y desnaturalizada durante 3 minutos a  $100^{\circ}\text{C}$  y se añadió a la solución de hibridación. La hibridación se hizo durante la noche a  $65^{\circ}\text{C}$ . Después, la membrana se lavó a  $65^{\circ}\text{C}$  dos veces con 2x SSPE, 0.1% SDS; una con 1x SSPE, 0.1% SDS y una más

con 0.1x SSPE, 0.1% SDS. Finalmente la membrana se expuso sobre un film (Biomax MS, Kodak). Como control, se utilizó el mismo procedimiento usando como sonda la ubiquitina.

## 7. Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteína.

### 7.1. Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en esta tesis, así como su procedencia, especie, tipo (monoclonal o policlonal), aplicaciones y diluciones empleadas se detallan en la Tabla 4.

Anticuerpo	Proveedor	Dilución		
		WB	IHQ/ICQ	IF
<b>Sph</b> (Policlonal conejo)	Chemicon AB5669	(0.25µg/ml)	8 / 2 (µg/ml)	
<b>P53 FL393</b> (policlonal conejo)	Santa Cruz sc-6243	1:1000		1:200
<b>p21 C-19</b> (Policlonal conejo)	Santa Cruz sc-397	1:500		
<b>p19<sup>ARF</sup></b> (Policlonal conejo)	Abcam ab80 / 104996	0.3µg/ml		0.3µg/ml
<b>p14<sup>ARF</sup></b> (policlonal conejo)	S. Llanos & G. Peters			1:200
<b>p16 (m-156)</b> (Policlonal conejo)	Santa Cruz sc-1207	1:500		
<b>HA</b> (Monoclonal ratón)	Covance	1:1000		1:1000
<b>PP1a</b> (Policlonal conejo)	Calbiochem	1:750		
<b>pRb</b> (Monoclonal ratón)	BD Pharmingen 554136	1:400		
<b>pRb<sup>P</sup></b> (Ser807/811)(Policlonal conejo)	Cell Signaling	1:250		
<b>α-tubulina</b> (Monoclonal ratón)	Sigma 9026	1:10000		
<b>CiclinaD1</b> (72-13G)(Monoclonal ratón)	Santa Cruz sc-450	1:1000		
<b>P27<sup>Kip1</sup></b> (Monoclonal ratón)	BD 610241	1:2500		
<b>Ciclina A (H-432)</b> (Policlonal conejo)	Santa cruz sc-751	1:1000		
<b>Ciclina E</b> (Policlonal conejo)	Abcam (AB7959)	1:100		
<b>HistonaH2AXp(ser139)</b> (Monoclonal)	Millipore 05-636			1:100
<b>53BP1</b> (Policlonal conejo)	Novus Biologicals NB100-304			1:100
Cabra anti-conejo (Policlonal)	Calbiochem 401315	1:4000	- / 1:200	
Conejo anti-ratón (Monoclonal)	Promega W402B	1:5000		
Cabra anti-ratón 800 (Monoclonal)	Thermo 35521	1:4000		
Cabra anti-conejo 800 (Policlonal)	Rockland 1003724	1:4000		
Cabra anti-ratón 680 (Monoclonal)	Invitrogen A21057	1:4000		
Cabra anti-conejo 680 (Policlonal)	Invitrogen A21076	1:4000		
Cabra anti-ratón 633 (Monoclonal)	Invitrogen A21050			1:100
Cabra anti-conejo 633 (Policlonal)	Invitrogen A21070			1:100
Cabra anti-ratón 488 (Monoclonal)	Invitrogen A11017			1:100
Cabra anti-conejo 488 (Policlonal)	Invitrogen A21206			1:100

**Tabla 4. Características de los anticuerpos utilizados.** WB: western blot; IHQ: inmunohistoquímica; ICQ: inmunocitoquímica; IF: inmunofluorescencia.

### 7.2. Extracción de proteína total.

Las células se lavaron con PBS dos veces y se añadió sobre ellas un volumen apropiado de tampón de lisis. Se recogieron los lisados mediante raspado, en hielo, y se echaron a un tubo de 1.5 ml. Los restos de debris celular se eliminaron por centrifugación a 15000 x g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante (extracto proteico) se guardó en alícuotas a -80°C. También se obtuvieron lisados de proteína a partir de tejidos de ratón conservados a -80°C, se añadió el tampón de lisis sobre el fragmento de tejido, se disgregó por rozamiento a 4°C, se recogió el volumen en tubos de 2ml, se centrifugó a 15000 x g durante 30min a 4°C para eliminar los restos de tejido sin disgregar y el sobrenadante se

guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La cuantificación de los extractos proteicos se realizó usando el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control la albúmina sérica (BSA).

*Tampón de lisis:* Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NP-40 1%, NaCl 150 mM. Además, añadimos inhibidores de fosfatasas (un inhibidor general de fosfatasas:  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  20mM; más un inhibidor de serín treonín fosfatasas: NaF 100 mM; más un inhibidor de tirosina fosfatasas:  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2mM, o un cóctel de inhibidores de fosfatasas: PhosSTOP Roche), e inhibidores de proteasas (Cóctel Complete, EDTA-free Roche Molecular Biochemicals, más leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  y aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Roche). En el caso de lisis de tejidos se añadió al tampón de lisis algún inhibidor extra de fosfatasas (ácido okadaico 0.1 $\mu\text{M}$ ) y de proteasas (Inhibidor de tripsina 0.1mg/ml, benzamidina 5mM, bestatina, quimostatina 0.01mg/ml, E64 0.01mg/ml, pepstatin 0.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , fosforamidon 0.3mg/ml, pefabloc 1mg/ml y antipain 0.05 mg/ml).

### 7.3. Western blot.

La inmunodetección de proteínas sobre membranas de PDVF (Immobilon-P, Millipore) o nitrocelulosa (Hybond ECL; Amersham) se realizó de acuerdo a un protocolo estándar. En primer lugar, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (con una concentración dependiente del tamaño de la proteína a detectar 6-15% o en geles prefabricados Biorad Criterion en gradiente 4-20%) en presencia de SDS, utilizando el sistema Mini-Protean 3 o Midi Criterion Precast Gel System (BioRad).

Después de determinar la cantidad apropiada de proteína, las muestras se disolvieron en *tampón de carga* (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoethanol 5%, azul de bromofenol 0.0025% (Sigma)) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS en tampón de electroforesis (5X: Tris HCl 0.13 M, glicina 0.95 M, SDS 0.5%) y se transfirieron a membranas de PDVF o nitrocelulosa, según el caso, utilizando un equipo Mini Trans-Blot Cell o Midi Criterion Blotter (BioRad). La transferencia se realizó a 200 mA durante 2h (equipo Midi Trans-Blot Cell) o a 400mA durante 2h (Midi Criterion Blotter) en *tampón de transferencia* (TrisHCl 0.025 M, glicina 0.2 M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon durante 2h en agitación. El tampón de bloqueo contenía TBS, 0.1% Tween20 y 1% de BSA o 2.5% de leche en polvo desnatada o tampón de bloqueo comercial para Odyssey (Li-Cor). Se incubaron sucesivamente con la dilución adecuada de anticuerpo primario y una dilución de 1:4000-1:5000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidada o marcado con un fluorocromo (diluido en tampón de bloqueo). La detección se realizó mediante una reacción quimioluminiscente (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) y la visualización con películas

Kodak-X-Omat LS (Kodak) o mediante el uso del sistema de imagen infrarrojo Odyssey (Li-Cor).

#### 7.4. Cuantificación de bandas de Western blot.

Para cuantificar las bandas de proteínas cuando el sistema de detección utilizado fue una reacción quimioluminiscente, utilizamos un escáner de Biorad para escanear la película y el programa quantity one para hacer la cuantificación. Para cuantificar las bandas de proteínas cuando el sistema de detección utilizado fue el sistema de imagen infrarrojo Odyssey (Li-cor), utilizamos el programa de cuantificación asociado al sistema de Li-cor. En los dos casos, se restó el fondo inespecífico a cada banda cuantificada, y siempre se refirió el valor a un control de carga de la misma membrana, que normalmente fue tubulina.

Para determinar la significación estadística de la reducción de los niveles proteicos de Ppp1ca en MEFs Sph (-/-) se utilizó el programa informático GraphPad PRISM y un test one way anova.

#### 7.5. Inmunofluorescencia (IF).

Se sembraron  $1 \times 10^4$  células en placas de 12 pocillos donde se había introducido previamente un cubreobjetos circular estéril de 1 cm. Al día siguiente se cambió el medio y se realizó el tratamiento correspondiente, en caso necesario. Cuando terminó la incubación, se lavaron las células con PBS, se fijaron con una solución de paraformaldehído fresco al 4% (Sigma) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con tritón al 0.5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se incubaron las muestras en solución de bloqueo (PBS con BSA 3%) durante 15 minutos. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario 30 minutos a 37°C y después de lavar con PBS, se añadió el anticuerpo secundario Alexa 633 o 488 1:100 durante 30min a 37°C, en la oscuridad. Para estudios de colocalización de dos proteínas, después de la incubación con el primer anticuerpo primario y su secundario, se incubó, en las mismas condiciones, con el segundo anticuerpo primario, que debía estar generado en una especie diferente al primer anticuerpo primario, y con el segundo anticuerpo secundario, que debía estar marcado con un fluoróforo diferente al del primer anticuerpo secundario. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 en dilución 1:1000 durante 2 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se montaron los cristales con Mowiol (Calbiochem). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal (TCS-SP2-AOBS). Se utilizaron láseres de 633 y 488 nm de He/Ne para la excitación de Alexa 633 y 488, respectivamente. La excitación de Hoechst 33258 se hizo con láser UV.

### 7.6. Inmuocitoquímica (ICQ).

Se tripsinizaron células de una placa de 10 cm y sin retirar el medio, se introdujeron en el adaptador cónico para hacer el citoespín (centrifugación a 1000rpm 5min). Los portaobjetos se dejaron secar durante una noche y a la mañana siguiente se fijaron las células con acetona durante 10 minutos. Después se realizó la incubación con el anticuerpo primario en PBS con 3% de FBS, durante media hora. Tras dos lavados con PBS, se incubó con una dilución 1:50 del anticuerpo secundario conjugado con HRP (DAKO). Finalmente, se hizo la detección usando diaminobencidina durante 5 minutos (Chemmate, Dako), siguiendo el protocolo del fabricante. La contratinción se hizo con hematoxilina de Harris durante 2 min. El montaje se realizó con Aquatex (Merck). Las fotos se tomaron con un microscopio Olympus Provis AX70.

### 7.7. Inmunohistoquímica (IHQ).

Se extrajeron muestras de los diferentes tejidos de los ratones y se fijaron en formalina al 4% tamponada, durante 24h. Tras un proceso de deshidratación con etanol a distintas concentraciones y xilol, se introdujeron las muestras en parafina a 65°C, obteniendo bloques de los que se hicieron cortes de 2 µm en microtomo automático. Para la tinción con Sph se rehidrataron las muestras por el procedimiento habitual y se hizo la recuperación antigénica con tampón citrato a pH 6.5 calentando en una olla a presión durante 2 min. Se eliminaron los restos de citrato con agua destilada y se lavó con TBS+Tween 20. Tras un bloqueo de la peroxidasa endógena con agua oxigenada y metanol (DAKO), se bloqueó con suero de ratón y se visualizó con M.O.M (sistema peroxidasa), como sustrato se usó aminobencidina plus (DAKO). La contratinción se hizo con hematoxilina de Harris. Finalmente, se deshidrató completamente la muestra con xilol y el montaje se hizo con Pertex. Las fotos se tomaron con un microscopio Olympus Provis AX70.

## Resultados

---





## 1. Estudio del papel celular de Sph y su relación con pRb y p53.

### 1.1. Efecto de la ausencia de Sph en el proceso de senescencia.

El antisentido frente a *sph* fue identificado en un rastreo genético basado en el proceso de senescencia celular (ver introducción). En primer lugar, quisimos estudiar el efecto de la ausencia de Sph en este proceso en MEFs.

#### 1.1.1. Efecto del fragmento antisentido frente a *sph* en senescencia.

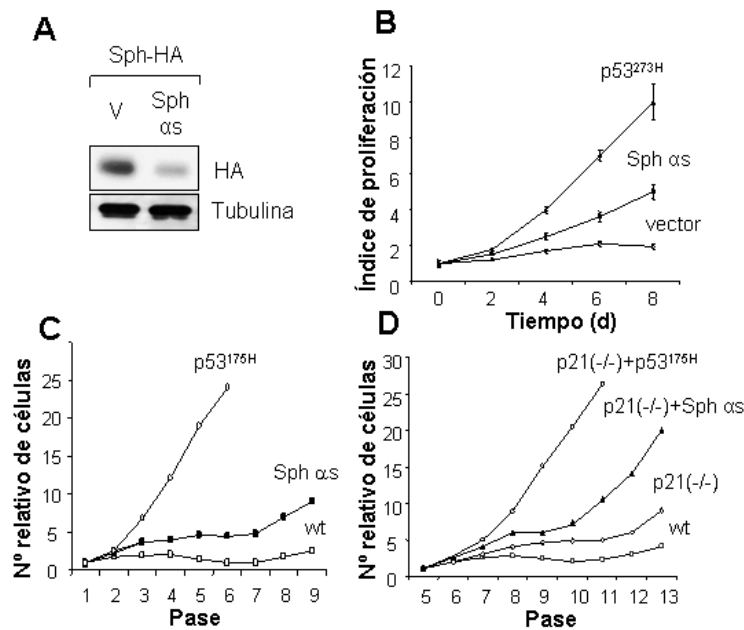
Primeramente validamos el efecto del fragmento antisentido frente a *sph* aislado en el rastreo genético. Para ello expresamos en NIH3T3 el gen *sph* de ratón unido a un dominio HA para la posterior identificación. Tras seleccionar el cultivo para la expresión de *sph*-HA, éste se infectó con virus que portaban el antisentido identificado. El antisentido frente a *sph* produjo una disminución en los niveles de proteína Sph-HA ectópica de más del 50% (Figura 5A).

A continuación estudiamos el efecto de la expresión del fragmento antisentido en la proliferación de células en su entrada en senescencia. En primer lugar, infectamos MEFs en fase 2 con retrovirus que portaban el fragmento antisentido. Como controles usamos vector vacío y el mutante de p53<sup>273H</sup> que confiere replicación ilimitada a estas células. Las células se seleccionaron para la inserción de los retrovirus y se sembraron para medir la proliferación en fase 5, momento en el cual los MEFs normalmente entran en senescencia. Observamos que los MEFs expresando vector vacío entraban en parada replicativa en fase 5 ó 6 limitando el crecimiento de la población (Figura 6B), los MEFs que expresaban el fragmento antisentido, aunque también entraban en parada replicativa, presentaban un índice proliferativo ligeramente mayor (Figura 6B). Esto indicaba que estas células tenían alguna duplicación más que las células control. Sin embargo, no presentaban capacidad replicativa ilimitada como las células expresando p53<sup>273H</sup> (Figura 5B).

Para confirmar el efecto del fragmento antisentido en la población celular, realizamos un protocolo 3T3 (ver M&M). La expresión de dicho antisentido aumentó la vida replicativa de los MEFs en cultivo en 2-4 duplicaciones celulares, aunque finalmente las células entraron en senescencia. Sin embargo, a pesar de no evadir la senescencia parecía facilitar la salida de ella, ya que se observó una inmortalización temprana de los cultivos (Figura 5C).

Para estudiar si el efecto sobre la inmortalización producido por el fragmento antisentido contra *sph* podría complementarse con otras mutaciones colaboradoras, se expresó dicho antisentido en MEFs de ratones que no expresaban p21<sup>waf1</sup> (p21 (-/-)). Así se encontró un efecto aditivo entre el fragmento antisentido contra *sph* y la ausencia de p21<sup>waf1</sup> retrasando su entrada en senescencia (Figura 5D). Las células p21 (-/-) que expresaban el antisentido

también se immortalizaron antes que las que no lo expresaban (Figura 5D). Este efecto aditivo no se observó en células  $p27^{kip1}(-/-)$ ,  $p15^{INK4b}(-/-)$ ,  $p16^{INK4a}(-/-)$  y  $p18^{INK4c}(-/-)$  (datos no mostrados).

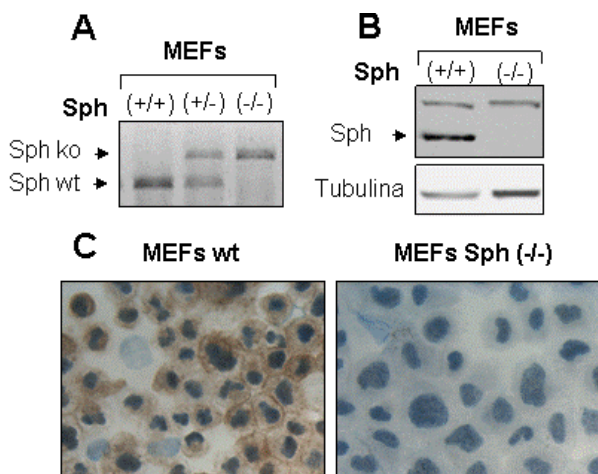


**Figura 5 El fragmento antisentido frente a *sph* incrementa la tasa de proliferación de los MEFs y facilita su immortalización. (A) Validación del fragmento antisentido.** Células NIH3T3 previamente seleccionadas para la expresión del gen *sph*-HA fueron transducidas con el fragmento antisentido frente a *sph* (Sph  $\alpha s$ ), y el vector vacío como control (V). Tras la selección, se extrajo proteína y se analizaron los niveles de Sph con un anticuerpo frente a HA. **(B) Curva de crecimiento de MEFs expresando el antisentido durante su entrada en senescencia.** Se infectaron MEFs presenescentes en pase 2 con virus que portaban el fragmento antisentido frente a *sph* (Sph  $\alpha s$ ),  $p53^{273H}$  como control positivo ( $p53^{273H}$ ), o el vector vacío (vector). Tras la selección, las células se sembraron en pase 5 en baja densidad y se realizó una curva de crecimiento. Se representa la media de 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar. **(C) y (D) Protocolo estándar 3T3 en MEFs wt (C) o MEFs p21 (-/-) (D)** tras la infección con virus que portaban el vector vacío (wt) el antisentido de Sph (Sph  $\alpha s$ ) o el mutante de  $p53^{175H}$  ( $p53^{175H}$ ).

Estos datos sugerían que la ausencia de Sph tendría un efecto parcial en la immortalización de MEFs y muy probablemente cooperante con otras mutaciones. Con objeto de estudiar en profundidad este punto, decidimos usar MEFs procedentes de ratones Knock-out (KO) para *sph* (48).

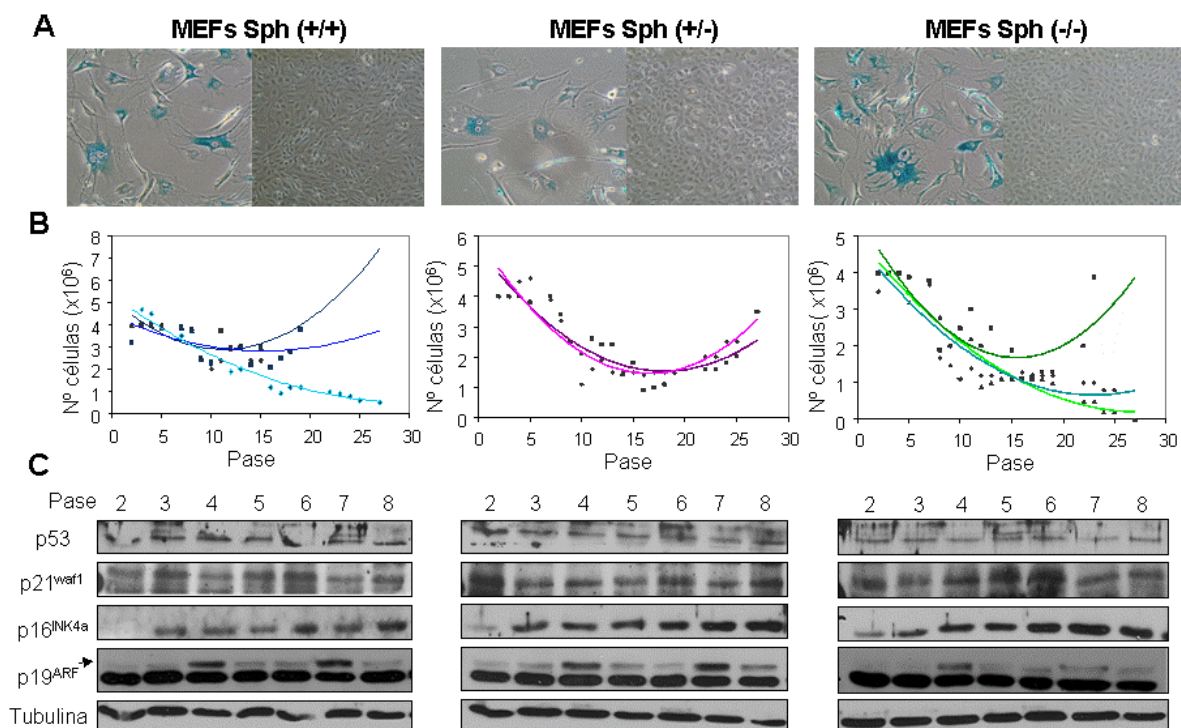
### 1.1.2. Efecto de la ausencia de Sph en el proceso de senescencia.

Generamos MEFs a partir de embriones procedentes del cruce de ratones heterocigotos para *sph* de la línea Sph KO (ratones Sph (+/-)), lo que nos permitiría obtener los tres genotipos posibles procedentes de la misma camada y genéticamente idénticos excepto en los niveles de Sph (Figura 6).



**Figura 6 Valoración de los niveles de Sph en los MEFs obtenidos a partir de ratones heterocigotos para *sph* (Sph (+/-)) (48).** **(A) Genotipaje de MEFs por PCR.** Mediante PCR comprobamos la ausencia parcial y total de *sph*. Para ello utilizamos un cebador diseñado frente al gen de resistencia a neomicina incorporado para sustituir el exón 1 de *sph*, y dos diseñados frente a *sph*, uno dentro y otro fuera de la región eliminada. De tal manera que cuando el exón 1 era eliminado, se amplificaba un fragmento de menor tamaño entre el cebador de fuera de la región de *sph* eliminada y el cebador frente al gen de neomicina. **(B) y (C) Valoración de los niveles proteicos de Sph en MEFs.** Comprobamos que esta eliminación del exón 1 de *sph* se traducía en la pérdida de expresión de la proteína Sph, se comprobó tanto por WB (B) como por ICQ (C).

Tras caracterizar la expresión de Sph en dichos MEFs, analizamos el proceso de senescencia mediante un protocolo 3T3. Todos los genotipos, independientemente del nivel de Sph, entraban en senescencia de forma similar (Figura 7A panel izquierdo y 7B) y se immortalizaron aleatoriamente sin influencia aparente de los niveles de Sph (Figura 7B). Una vez immortalizados los clones presentaron un aspecto similar (Figura 7A panel derecho). El análisis de marcadores moleculares de senescencia como las proteínas p53, p21<sup>waf1</sup>, p16<sup>INK4a</sup> y p19<sup>ARF</sup> mostró que, como ha sido descrito, los niveles de las proteínas p21<sup>waf1</sup>, p16<sup>INK4a</sup> y p19<sup>ARF</sup> aumentaban con los diferentes pases, mientras que los niveles de p53 se mantenían estables, no encontrando diferencias aparentes entre los tres genotipos (Figura 7C).



**Figura 7 La ausencia de Sph no altera el proceso de senescencia. (A) Caracterización visual de la entrada en senescencia y de la immortalización.** Fotos de MEFs de genotipos wt para *sph* (Sph (+/+)), heterocigotos para *sph* (Sph (+/-)) y con delección homocigota de *sph* (Sph (-/-)). Las fotos se realizaron durante un protocolo estándar 3T3, se tomaron en el momento de la entrada en senescencia (izquierda: teñidas con SA-β-Gal) y de la immortalización (derecha). **(B) Caracterización gráfica de la entrada en senescencia y de la immortalización.** Representación gráfica del número de células (eje Y) frente al número de pase (eje X) y su interpretación mediante una curva polinómica para cada clon de cada genotipo. **(C) Caracterización molecular de la entrada en senescencia.** Estudio de los niveles de las proteínas p53, p21<sup>waf1</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p19<sup>ARF</sup> durante los ocho primeros pases del protocolo 3T3.

## 1.2. Efecto de la ausencia de Sph sobre Ppp1ca.

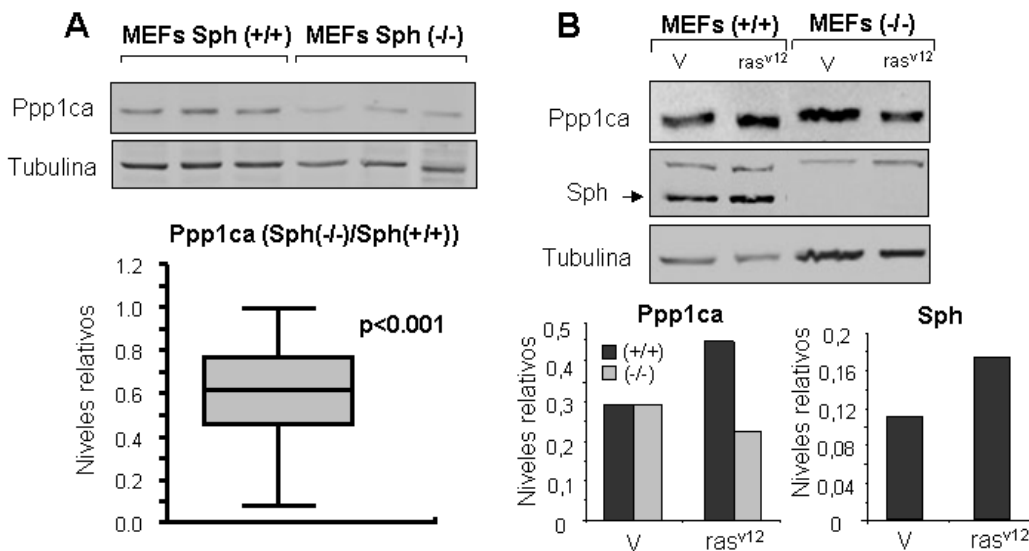
Sph (Ppp1r9b) ha sido descrita como un regulador de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 isoforma α (Ppp1ca) (1, 9, 70, 90, 141, 142, 158). Trabajos del grupo han demostrado previamente que Ppp1ca puede estar involucrada en el proceso de senescencia a través de la regulación de la fosforilación de pRb (22, 119).

Dado que Sph se asocia a Ppp1ca, decidimos estudiar en primer lugar esta relación en MEFs defectivos para Sph.

### 1.2.1. La ausencia de Sph reduce los niveles de Ppp1ca y bloquea el incremento de Ppp1ca inducido por *ras* oncogénico.

Para determinar el efecto de la ausencia de Sph en los niveles de Ppp1ca, analizamos en paralelo los niveles de Ppp1ca de diferentes clones de MEFs ( $n=20$  pares) de genotipo Sph (+/+) y Sph (-/-). Observamos que en ausencia de Sph se producía una disminución variable, del 40% de media, en los niveles de la proteína Ppp1ca (Figura 8A). Esto sugería que en ausencia de Sph, Ppp1ca podría ser menos estable, disminuyendo sus niveles celulares.

Está descrito que el oncogén *ras* induce un aumento en los niveles de Ppp1ca (22), desempeñando un papel importante en la senescencia inducida por *ras* (22, 119). Por tanto, quisimos comprobar qué ocurría con Ppp1ca en ausencia de Sph en MEFs que expresaban *ras* oncogénico. Para ello utilizamos MEFs presenescentes wt y Sph (-/-) y los infectamos con virus que portaban el oncogén *H-ras*<sup>v12</sup>. Tras seleccionar, observamos que tanto los MEFs wt como sin Sph entraban en senescencia de forma similar (datos no mostrados). Para valorar el efecto a nivel molecular, extrajimos proteína total para determinar qué ocurría con los niveles de Ppp1ca. Observamos que H-Ras<sup>v12</sup> inducía un aumento en los niveles de Sph concomitante con Ppp1ca y que el aumento de Ppp1ca inducido por Ras<sup>v12</sup> no se producía en ausencia de Sph (Figura 8B).



**Figura 8 La ausencia de Sph produce una disminución en los niveles de Ppp1ca y bloquea el incremento de Ppp1ca inducido por el oncogén *H-ras*<sup>v12</sup>. (A) Niveles de Ppp1ca en ausencia de Sph.** Se valoró el contenido de Ppp1ca por WB de 3 clones independientes Sph (-/-) y 3 wt procedentes de la misma camada, en crecimiento exponencial (panel superior). El contenido de Ppp1ca de un mínimo de 20 pares de clones en experimentos independientes fue valorado para obtener datos cuantitativos. El contenido en Ppp1ca fue normalizado en cada clon respecto a su contenido en tubulina y éstos referidos a los wt (nivel relativo 1) en cada experimento. La significación estadística se determinó mediante un test one way anova ( $p \leq 0.001$ ). **(B) Valoración del incremento de Ppp1ca por *H-ras*<sup>v12</sup> en ausencia de Sph.** Se transdujeron MEFs wt y Sph (-/-) con *H-ras*<sup>v12</sup> y tras seleccionar, se recogió proteína total y se midieron los niveles de Ppp1ca y Sph. En el panel inferior se representan los valores de Ppp1ca y Sph normalizados respecto a los de tubulina. Experimento representativo de 3 experimentos realizados independientemente.

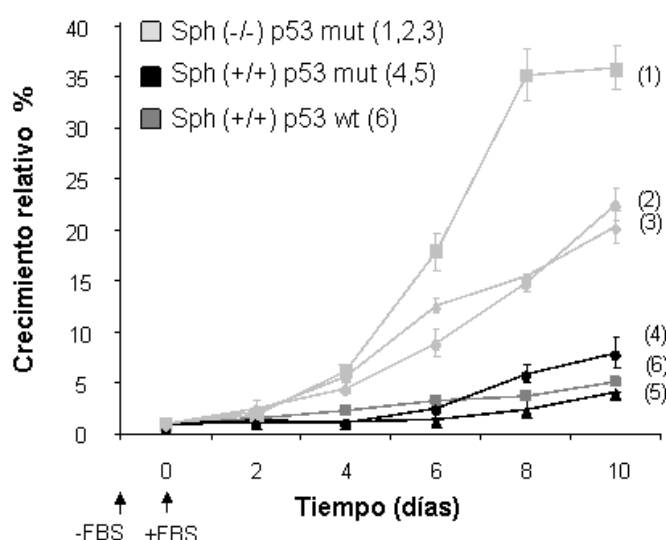
Esto confirmaba la relación entre Sph y Ppp1ca. Sph parece estabilizar Ppp1ca y la desaparición de Sph parece limitar el aumento de los niveles de Ppp1ca inducidos por Ras en la célula.

### 1.3. Efecto de la ausencia de Sph sobre el supresor tumoral producto del gen *retinoblastoma*, pRb.

Como hemos observado anteriormente, existe una relación entre Sph y la subunidad catalítica de PP1 $\alpha$ , Ppp1ca. Se ha descrito la existencia de una relación entre PP1 $\alpha$  y el supresor tumoral pRb, PP1 $\alpha$  defosforila a la proteína pRb activándola. Por tanto, quisimos estudiar qué ocurría con la activación de pRb en ausencia de Sph.

#### 1.3.1. La ausencia de Sph produce una recuperación temprana del crecimiento tras la retirada del suero.

Para estudiar el proceso de fosforilación/defosforilación de pRb, realizamos un ensayo de crecimiento tras retirar el suero durante 24 horas. Así, medimos la capacidad de las células de recuperarse de la ausencia de los factores de crecimiento, característica que depende de la fosforilación y por tanto de la función de pRb. Se sembraron las células, a las 16h se retiró el suero con el fin de sincronizar las células en fase G0. 24h después de retirar el suero, se añadió de nuevo suero para medir la entrada en ciclo y se analizó el crecimiento relativo cada dos días. Como el experimento se realizó con MEFs Sph (+/+) y Sph (-/-) immortalizados, elegimos clones Sph (+/+) con p53 wt y mutado, sin embargo, los clones Sph (-/-) sólo podían ser con p53 mutado (ver apartado 1.4.3). Observamos que los MEFs que no expresaban Sph, recuperaban su capacidad de crecimiento antes que los MEFs wt para Sph (Figura 9). El experimento también se realizó con MEFs presenescentes wt y Sph (-/-) con los que se observaron resultados similares. Estos datos sugerían que la ausencia de Sph podría favorecer la fosforilación de pRb provocando una salida temprana de quiescencia.



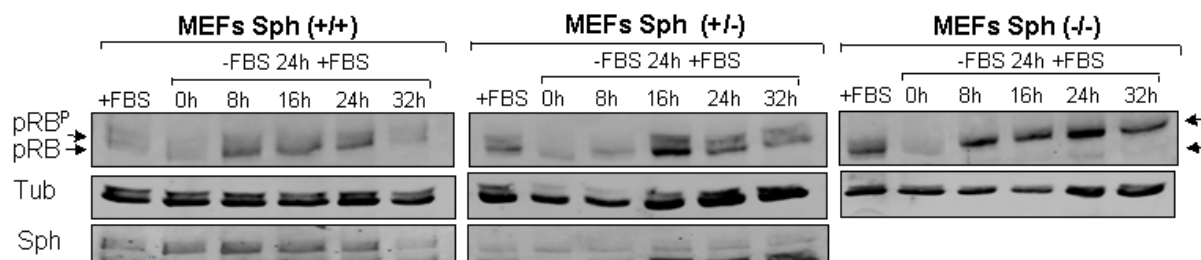
**Figura 9 La ausencia de Sph produce una recuperación temprana del crecimiento. Curva de crecimiento de MEFs sin Sph tras 24h sin suero.** Crecimiento relativo de MEFs immortalizados con niveles normales de Sph y p53 normal (Sph (+/+) p53 wt) clon 6, o Sph normal y p53 mutado (Sph (+/+) p53 mut) clones 4 y 5, o sin Sph con p53 mutado (Sph (-/-) p53 mut) clones 1, 2 y 3. Las células fueron mantenidas en ausencia de suero durante 24h, tras ese tiempo se añadió medio con 10% de FBS y se realizó una curva de crecimiento. El crecimiento celular relativo hace referencia a la relación entre el crecimiento en ese día con respecto a la misma población celular a día 0. Se representa la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. Experimento representativo de 4 experimentos realizados de forma independiente.



### 1.3.2. La ausencia de Sph produce la inactivación temprana de pRb tras estimulación con suero.

Con objeto de estudiar el papel de Sph y pRb en el efecto biológico de recuperación del crecimiento en los MEFs, estudiamos qué ocurría con la fosforilación de pRb tras inducir el ciclo celular al añadir suero a células quiescentes. Para ello se añadió 10% de FBS a células que habían estado 24h sin suero y se analizó por WB la fosforilación de pRb y los niveles de Sph.

Observamos que mientras en células *sph* wt (*Sph* (+/+)) se observaba un aumento de la hiperfosforilación de pRb a las 24h y en heterocigotos para *sph* (*Sph* (+/-)) a las 16h, en células sin Sph (*Sph* (-/-)) pRb se encontraba inactivado por hiperfosforilación a las 8h (Figura 10). Es decir, en MEFs que no expresaban Sph se recuperaba antes el estado inactivo hiperfosforilado de pRb. Esto explicaría porqué estas células recuperaban su crecimiento antes que las células con Sph. Además, en los MEFs wt, observamos que los niveles de Sph aumentaban ligeramente al retirar el suero y disminuían al recuperar el estado hiperfosforilado de pRb, lo que apoyaba la idea de que la presencia de Sph fuese necesaria para mantener el estado hipofosforilado de pRb y por tanto, la parada del ciclo celular. El estudio de forma similar de los niveles de otras proteínas que podían regular la entrada en fase S como p21<sup>waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, Ciclinas D1 y E mostró que no había diferencias significativas en su comportamiento al comparar entre MEFs wt y *Sph* (-/-) (datos no mostrados).



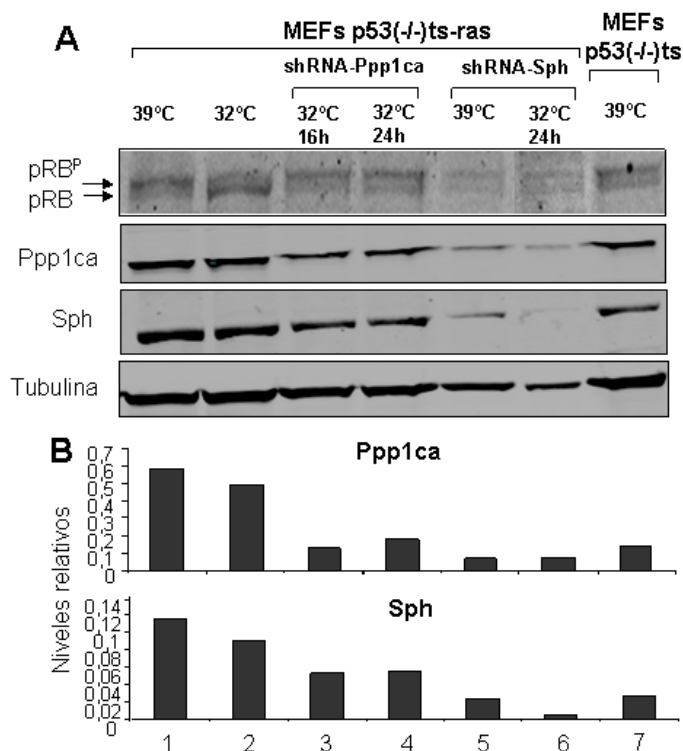
**Figura 10 Inactivación temprana de pRb en ausencia de Sph. Valoración de la fosforilación/defosforilación de pRb y de los niveles de Sph tras la adición de suero a células en quiescencia.** WB para Sph y pRb total (banda superior hiperfosforilada, pRb<sup>p</sup>, y banda inferior hipofosforilada, pRb). Se utilizaron MEFs de genotipos *Sph* (+/+), *Sph* (+/-) y *Sph* (-/-) a los que tras estar 24h sin suero (FBS) se les añadió 10% de FBS y se recogieron muestras de proteína a diferentes horas. Experimento representativo de 6 experimentos realizados de forma independiente.

### 1.3.3. La ausencia de Sph mantiene la inactivación de pRb en presencia de p53 activo.

Con objeto de confirmar la defosforilación defectiva que ocurre en pRb en ausencia de Sph, medimos el efecto de la ausencia de Sph sobre la inactivación de pRb en un modelo celular dependiente de p53. El modelo consistía en MEFs p53 (-/-) que expresaban

establemente el oncogén *H-ras*<sup>v12</sup> y un alelo mutante termosensible de *p53* (*p53*<sup>val135</sup>, *p53ts*), a estas células las denominamos MEFs *p53*(-/-)ts-ras. Estas células a la temperatura restrictiva (39°C) expresan la forma mutante de *p53* y crecen normalmente. A la temperatura permisiva (32°C) la proteína *p53ts* adopta una configuración normal que es activa transcripcionalmente y que provoca la parada del crecimiento. Esta parada del ciclo celular, debido a la presencia del oncogén *H-ras*<sup>v12</sup>, resulta irreversible y con características de senescencia (21).

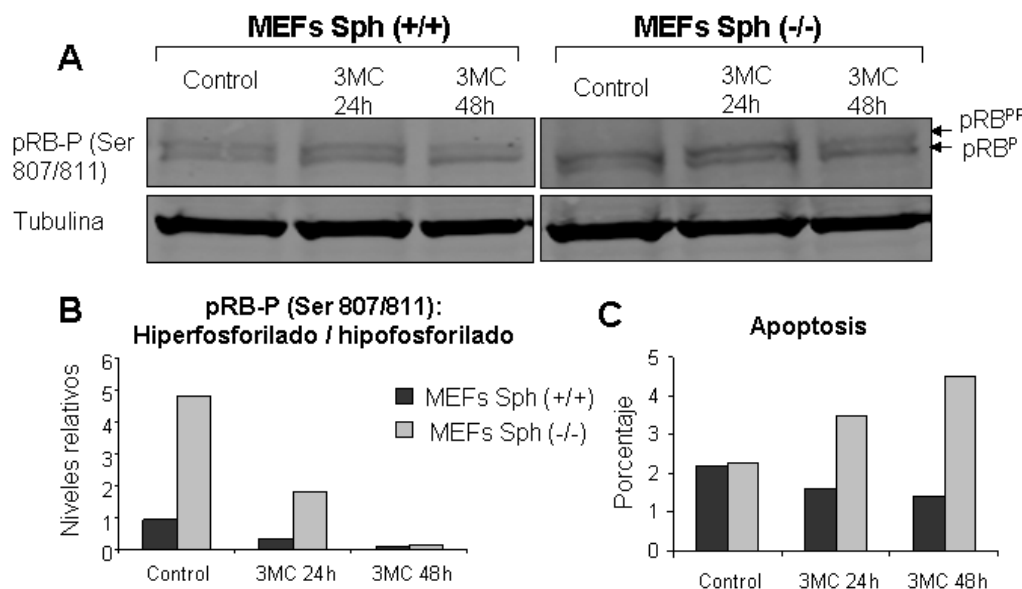
Infectamos estas células con virus que portaban un shRNA frente a *sph* murino o un shRNA frente a *ppp1ca*. Tras la selección, extrajimos proteína total de una placa de células mantenidas a 39°C y de otra mantenida a 32°C a las 16 y/o 24h. Como control, usamos las mismas células MEFs *p53*(-/-)ts-ras sin infectar a las dos temperaturas y las células MEFs *p53*(-/-)ts a 39°C. Analizamos los niveles de las proteínas pRb, Ppp1ca y Sph y observamos que cuando se reducían artificialmente los niveles de Ppp1ca, pRb se mantenía en su estado hiperfosforilado aunque las células estuvieran a la temperatura permisiva y se activara *p53* (Figura 11A, líneas 2, 3 y 4). Lo mismo fue observado al reducir artificialmente los niveles de Sph (Figura 11A, líneas 2 y 6). Por otro lado, observamos una reducción recíproca de los niveles de Sph y Ppp1ca al reducir artificialmente uno de ellos (Figura 11B, líneas 2, 4 y 6). De forma similar se observaba un aumento paralelo de Ppp1ca y Sph al sobreexpresar Ras oncogénico (Figura 11B, líneas 1 y 7). Esto confirma una estrecha relación entre ambas proteínas, posiblemente la presencia de una contribuya a la estabilización de la otra.



**Figura 11 La ausencia de Sph mantiene la inactivación de pRb en presencia de p53 activo. (A) Estudio de la relación entre los niveles de pRb fosforilado y defosforilado, Ppp1ca y Sph en MEFs que expresan el alelo termosensible de p53.** WB para pRb total (banda superior hiperfosforilada, pRb<sup>P</sup>, y banda inferior hipofosforilada, pRb), Ppp1ca y Sph. Se utilizaron MEFs *p53*(-/-)ts o MEFs *p53*(-/-)ts-ras, estos últimos se transdujeron con los shRNA frente a *ppp1ca* y *sph* (el sh2). Se extrajo proteína total de todos estos tipos celulares tras un cultivo de 16 y/o 24h a la temperatura permisiva (32°C) y restrictiva (39°C). **(B) Cuantificación de los niveles de Ppp1ca y Sph.** Se cuantificaron los niveles proteicos de Ppp1ca y Sph y se representaron referidos al control de carga tubulina. Experimento representativo de 4 experimentos realizados de forma independiente.

### 1.3.4. La ausencia de Sph mantiene la inactivación de pRb en respuesta al daño en el ADN.

Decidimos estudiar el efecto de la ausencia de Sph en la respuesta al daño en el ADN como mecanismo fisiológico de regular p53 y la fosforilación de pRb. Utilizamos MEFs wt y Sph (-/-) y los tratamos con 3-metil-colantreno (3MC), un compuesto que produce aductos en el ADN induciendo la activación de p53 a través de la activación de la vía de daño al ADN. A las 24 y 48 horas de añadir el tratamiento, se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de células que estaban en cada fase del ciclo celular, y mediante WB el estado de fosforilación de la proteína pRb. Observamos que mientras que el tratamiento en los MEFs wt producía un aumento de la hipofosforilación de pRb a las 24 y 48 horas, en los MEFs Sph (-/-) la hiperfosforilación de pRb se mantenía a las 24 horas observando el aumento de la hipofosforilación más tarde, a las 48h (Figura 12A). Esta diferencia se observaba mejor cuando se representaba el cociente entre pRb hiperfosforilado y pRb hipofosforilado (Figura 12B), este cociente siempre era mayor en los MEFs Sph (-/-), lo que indicaba que en estas células pRb estaba más fosforilado. Esta mayor fosforilación de pRb en MEFs Sph (-/-) se traducía en que las células tratadas no paraban su crecimiento sino que entraban en apoptosis, al contrario de lo que ocurría en los MEFs wt (Figura 12C). Estos datos sugerían que en ausencia de Sph la activación de la vía de pRb se veía comprometida, sin embargo, el aumento de apoptosis y la interconexión entre la ruta de pRb y la de p53 sugería que la vía de p53 podía estar más activada.



**Figura 12 La ausencia de Sph mantiene la inactivación de pRb y aumenta la apoptosis en respuesta al daño en el ADN. (A) Valoración de la fosforilación de pRb en MEFs sin Sph tratados con 3MC.** MEFs wt y Sph (-/-) fueron tratados con 3MC durante 24 y 48h, mediante WB se analizó la fosforilación de pRb (Ser 807/811) la banda superior es la banda hiperfosforilada (pRb<sup>PP</sup>) y la inferior es la hipofosforilada (pRb<sup>P</sup>). **(B) Cuantificación de la fosforilación de pRb en MEFs sin Sph tratados con 3MC.** Representación de la cuantificación de la banda hiperfosforilada referida a la banda hipofosforilada. **(C) Estudio de la apoptosis inducida por 3MC en MEFs sin Sph.** Representación del porcentaje de células en apoptosis en MEFs wt y Sph (-/-) tratados con 3MC durante 24 y 48 h. Experimento representativo de 3 experimentos realizados de forma independiente.

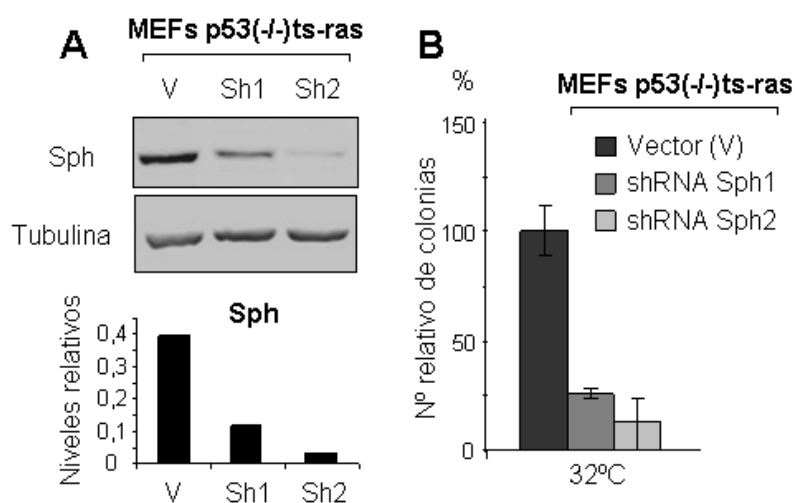


#### 1.4. Efecto de la ausencia de Sph sobre el supresor tumoral p53.

Se ha descrito la interconexión entre las dos vías de señalización más importantes en la supresión tumoral, la de pRb y la de p53 (ver introducción). Nos preguntamos si la ausencia de Sph, además de alterar la vía de pRb, podría alterar también la de p53.

##### 1.4.1. La ausencia de Sph aumenta la respuesta biológica de la activación de p53.

Utilizando el modelo celular donde podemos inducir a voluntad la activación de p53 (ver apartado 1.3.3), infectamos MEFs p53(-/-)ts-ras con dos shRNA frente a *sph*. Tras confirmar la eficiencia de los shRNA en la reducción de los niveles de la proteína Sph (más de un 50% el primero y alrededor de un 80% el segundo, Figura 13A), hicimos un ensayo de clonabilidad a la temperatura permisiva (32°C), contabilizando el número de colonias que escapaban a la parada del ciclo celular producida por la activación de p53. Al reducir los niveles de Sph el efecto de la activación de p53 aumentaba, reflejándose en un menor número de colonias (Figura 13B).

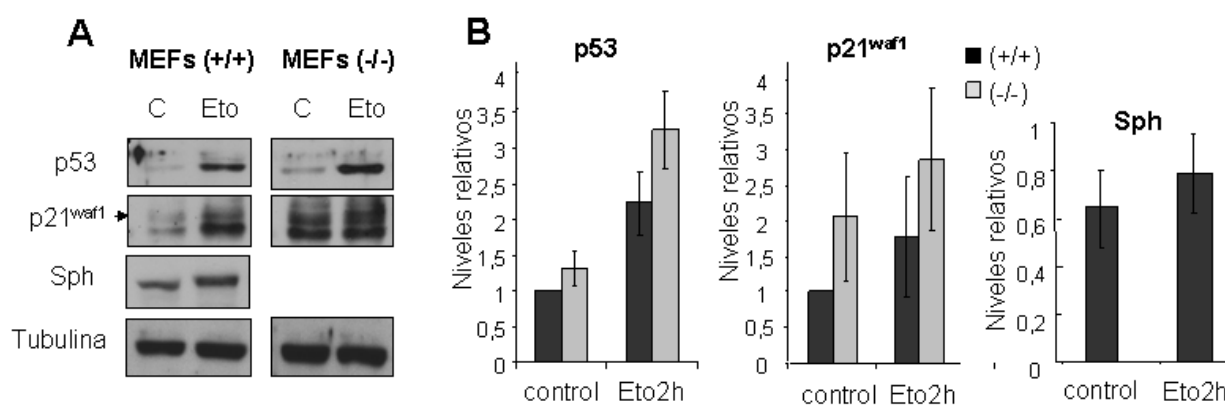


**Figura 13 La ausencia parcial de Sph aumenta la respuesta biológica de p53. (A) Valoración de la eficacia de los shRNA frente a *sph*.** Se infectaron MEFs p53(-/-)ts-ras con virus que portaban 2 shRNA frente a *sph* de ratón (sh1 y sh2) o el vector vacío (V), se seleccionaron, se recogió proteína total y se estudiaron los niveles de Sph. En el panel inferior se representa la cuantificación de los niveles de Sph referidos al control de carga tubulina. **(B) Ensayo de clonabilidad en MEFs con p53 activado y niveles reducidos de Sph.** Los MEFs p53(-/-)ts-ras seleccionados para la expresión de los shRNA frente a *sph* o de vector vacío se sembraron en baja densidad (10.000 células por placa de 10cm). 16h después de la siembra se cambiaron a 32°C y se mantuvieron durante 2 semanas. Posteriormente se cuantificó el número de colonias y se representó la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar.

##### 1.4.2. La ausencia de Sph induce la activación de p53 y aumenta su respuesta.

Como la ausencia parcial de Sph aumentaba la respuesta biológica de p53, nos preguntamos qué ocurriría con la ausencia total de Sph y con una activación de p53 más fisiológica. Para ello tratamos MEFs Sph (-/-) presenescentes con fármacos que dañan el ADN y activan la vía de p53. Observamos que al tratar las células con etopósido (un inhibidor de la topoisomerasa II que dificulta la replicación del ADN), los MEFs sin Sph

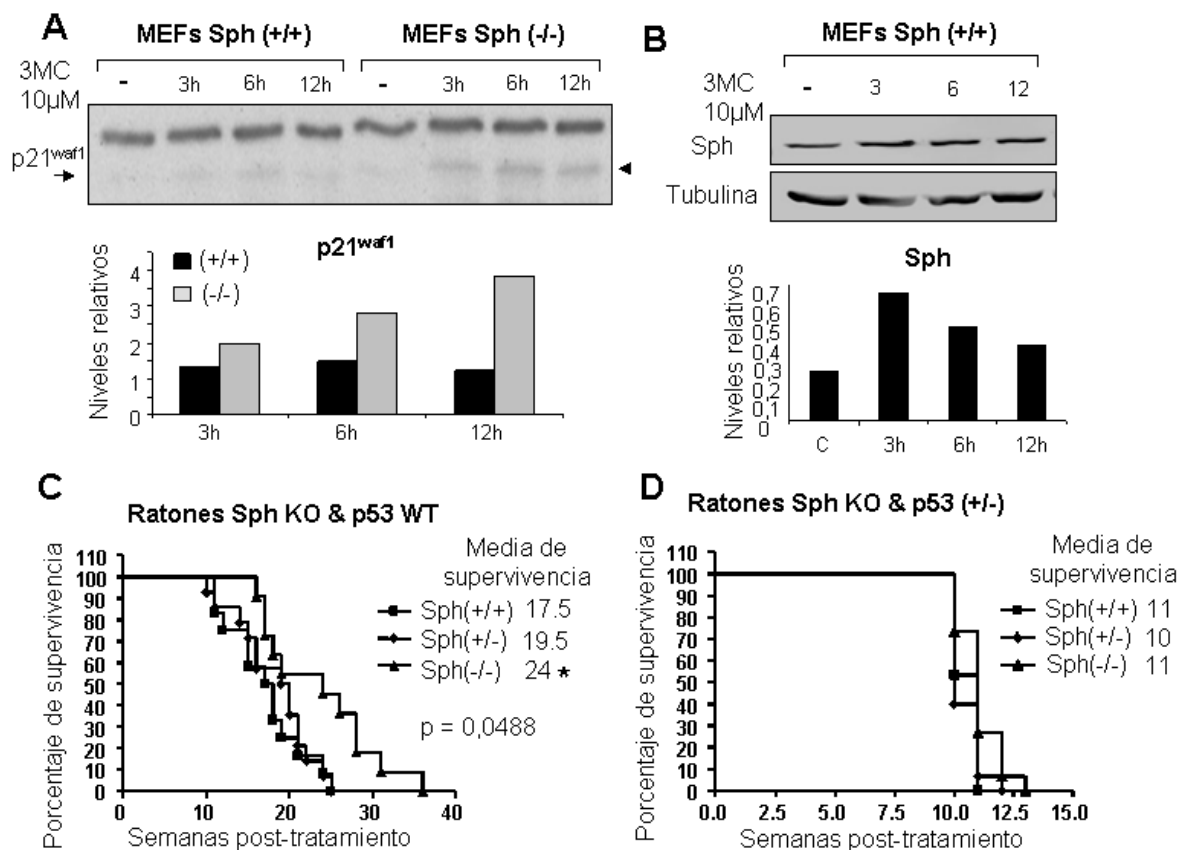
mostraban un mayor aumento de los niveles de p53 y de su diana transcripcional p21<sup>waf1</sup> que los MEFs wt. Este aumento en los niveles de p53 y p21<sup>waf1</sup> respecto a los MEFs wt también se observó en los niveles basales. Por otro lado, observamos que los niveles de Sph aumentaban con el tratamiento de etopósido (Figura 14A y 14B), lo que sugería que Sph pudiera estar involucrada en el control de los niveles de p53. Se observó el mismo efecto al tratar los MEFs con drogas que inducían senescencia, como UCN01 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (datos no mostrados).



**Figura 14 La ausencia de Sph aumenta la activación de p53 por etopósido. (A) Valoración de la activación de p53 por etopósido en MEFs sin Sph.** Se recogió proteína total de MEFs Sph (+/+) y Sph (-/-) tratados con etopósido 100μM durante 2h. Se estudiaron los niveles de las proteínas p53, p21<sup>waf1</sup> y Sph por WB. **(B) Cuantificación de los niveles de p53, p21<sup>waf1</sup> y Sph en MEFs tratados con etopósido.** Se cuantificaron los niveles de las proteínas p53, p21<sup>waf1</sup> y Sph y se refirieron a su control de carga tubulina. Se representó la media de 3 experimentos independientes ± desviación estándar. Experimento representativo de 4 experimentos realizados de forma independiente.

Por otro lado, decidimos utilizar 3-metil-colantreno (3MC), un compuesto que produce aductos en el ADN y que administrado como protocolo carcinogénico en ratones produce fibrosarcomas de forma dependiente de p53 (44). En primer lugar, comprobamos si el 3MC producía diferente activación de p53 en los MEFs Sph (-/-) y wt. Observamos que los niveles de p21<sup>waf1</sup> aumentaban más con el tratamiento en los MEFs Sph (-/-) que en los wt (Figura 15A). Además, se confirmaba que un compuesto que producía la activación de p53 aumentaba los niveles de Sph (Figura 15B). A continuación, decidimos administrar el protocolo carcinogénico con 3MC en ratones para valorar si el efecto observado era fisiológico *in vivo*. El protocolo consistía en una inyección intramuscular de 1mg de 3MC en una de las patas traseras de ratones de entre 3 y 5 meses de edad. Realizamos el tratamiento con 3MC en dos líneas diferentes, la línea Sph KO y la línea doble Sph KO con p53 KO. En la línea Sph KO, utilizamos cruces entre ratones heterocigotos para *sph* (Sph (+/-)) para generar tres cohortes (n=15 cada una de ellas) genéticamente idénticas excepto en el contenido de Sph (Sph (+/+), Sph (+/-) y Sph (-/-)). Para la línea doble Sph KO con p53 KO utilizamos cruces entre ratones dobles heterocigotos para *sph* y *p53* (Sph(+/-);p53(+/-)) para generar tres cohortes con fondo p53 (+/-) (n=15 cada una de ellas) genéticamente idénticas excepto en el contenido de Sph (ratones Sph(+/+);p53(+/-), Sph(+/-);p53(+/-) y

Sph(-/-);p53(+/-)). No utilizamos ratones que tuvieran eliminado completamente p53 del genotipo (p53 (-/-)) ya que morían muy rápido impidiendo el estudio. En primer lugar, en ratones sin Sph con p53 normal observamos que se producía un retraso en la aparición de los sarcomas, produciendo un aumento significativo de la supervivencia ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 15C). Mientras que la media de supervivencia de los ratones control (Sph (+/+)) era de 17.5 meses, en los ratones que no expresaban Sph (Sph (-/-)) era de 24 meses. Sin embargo, en ratones con fondo heterocigoto para *p53* (p53 (+/-)) la supervivencia de los tres genotipos de Sph (Sph(+/+);p53(+/-), Sph(+/-);p53(+/-) y Sph(-/-);p53(+/-)) era similar al tratarlos con 3MC (Figura 15D). Estos resultados sugerían que, en ausencia de Sph, al estar aumentada la respuesta de p53, se retrasaba la aparición de tumores en el tiempo. Sin embargo, cuando se reducían los niveles de p53, la ausencia de Sph dejaba de producir ese efecto.



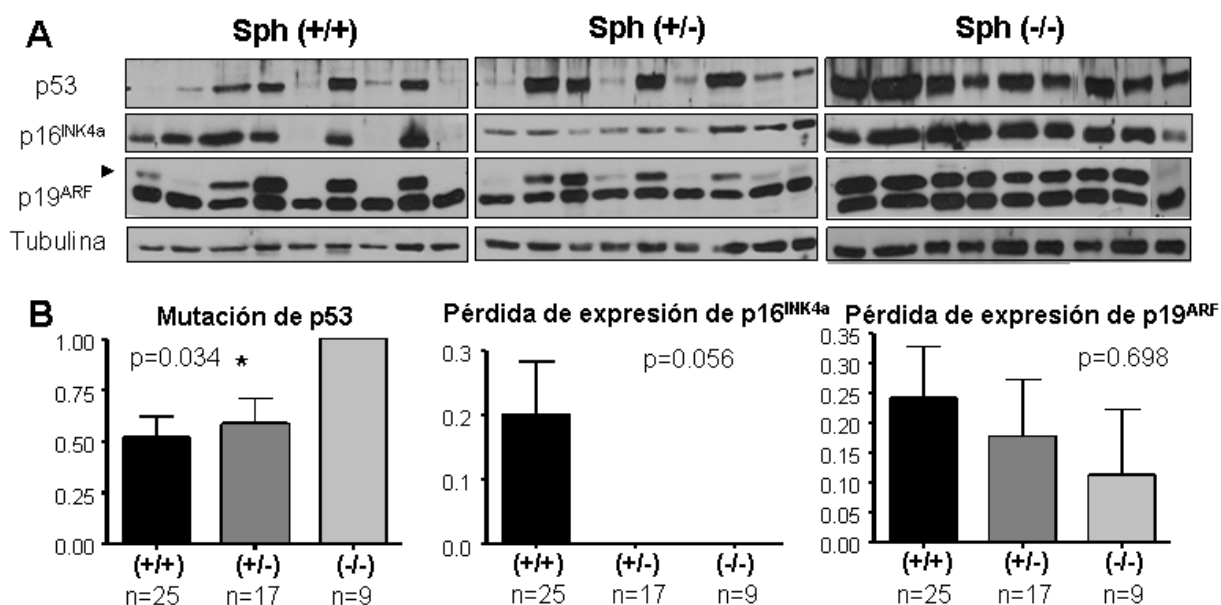
**Figura 15 La ausencia de Sph aumenta la activación de p53. Esta activación, en presencia de p53 wt, se traduce en una aparición más tardía de tumores inducidos carcinogénicamente con 3MC. (A) Valoración de la activación de p53 por 3MC en MEFs sin Sph y (B) Valoración de los niveles de Sph en MEFs tratados con 3MC.** MEFs wt y Sph (-/-) fueron tratados con 3MC 10 $\mu$ M durante 3, 6 y 12h. Se midieron los niveles de p21<sup>waf1</sup> (A) y Sph (B) por WB. En los paneles inferiores se representa la cuantificación de los niveles relativos referidos a los controles de carga. Experimento representativo de 4 experimentos realizados de forma independiente. **(C) y (D) Supervivencia de ratones sin Sph en un fondo wt o heterocigoto para p53 tratados con 3MC.** Se realizó un protocolo carcinogénico con 3MC, que consistió en administrar una dosis única de 1mg por vía intramuscular en una de las patas traseras del ratón. Se vigiló semanalmente a los ratones hasta la aparición de los sarcomas. Cuando los sarcomas alcanzaron 1cm de diámetro los ratones fueron sacrificados y se hicieron las necropsias. El tratamiento se hizo en dos líneas de ratones, en la línea Sph KO, con 3 cohortes de 15 ratones por genotipo: Sph (+/+), Sph (+/-) y Sph (-/-) (C) y en la línea doble Sph KO con p53 en heterocigosis (Sph KO & p53 (+/-)) con 3 cohortes de 15 ratones por genotipo: Sph(+/+);p53(+/-), Sph(+/-);p53(+/-) y Sph(-/-);p53(+/-) (D).

### 1.4.3. La ausencia de Sph induce la mutación de *p53* durante la inmortalización celular.

Nuestros datos sugerían una importante relación funcional de Sph con *p53*. Dado que *p53* es un factor esencial en el proceso de inmortalización de MEFs en cultivo, decidimos analizar lo que ocurría con esta proteína en dicho proceso.

La inmortalización espontánea de los MEFs va acompañada de la inactivación de genes supresores de tumores como *p53* y los pertenecientes al locus *INK4a* con frecuencias y características similares a aquellas encontradas en tumores humanos. Para estudiar qué ocurría en la inmortalización de los MEFs que no expresaban Sph, generamos numerosos clones inmortales de los genotipos Sph (+/+), Sph (+/-) y Sph (-/-). Se extrajo proteína total de todos los clones generados y se estudiaron los niveles de algunas proteínas involucradas en el proceso de inmortalización, como son los supresores de tumores *p53*, *p16<sup>INK4a</sup>* y *p19<sup>ARF</sup>*.

Medimos *p53* mutado a través de la acumulación de la proteína que se produce debido a su ausencia de degradación. Observamos que en todos los clones que no expresaban Sph (n=9) se había mutado *p53*, mientras que en los clones wt (n=25) *p53* solamente se mutaba en el 50% de los casos. Por el contrario, mientras que el 20% de los clones wt perdía la expresión de *p16<sup>INK4a</sup>*, ninguno de los clones heterocigotos u homocigotos para la pérdida de *sph* veían modificada la expresión de *p16<sup>INK4a</sup>*. Algo similar ocurría con la pérdida de expresión de *p19<sup>ARF</sup>*, en el caso de los clones que no expresaban Sph disminuía el porcentaje de clones que perdían la expresión de dicha proteína (Figura 16). Todos estos datos sugieren que la ausencia de Sph fuerza que la inmortalización ocurra a través de la mutación de *p53*, lo que tendría sentido teniendo en cuenta que la ausencia de Sph aumenta la activación de la vía de *p53*. Por lo tanto, para que la célula progrese a un fenotipo inmortal, necesitará evadir la respuesta de *p53* a través de su mutación.



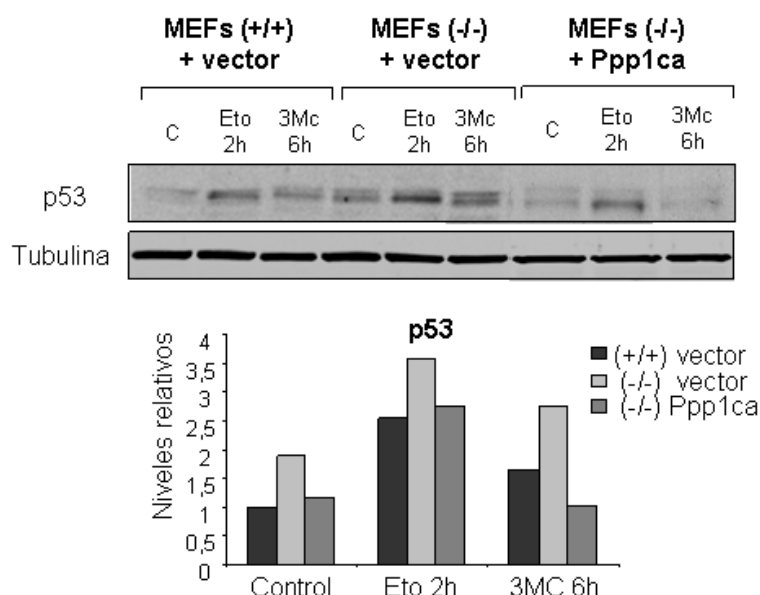
**Figura 16 En ausencia de Sph la inmortalización ocurre siempre a través de la mutación de p53. (A) Caracterización molecular de clones inmortalizados con diferentes niveles de Sph.** A partir de MEFs de genotipos Sph(+/+), Sph(+/-) y Sph(-/-) se obtuvieron diferentes clones inmortalizados, los cuales se ampliaron y se extrajo proteína total. Mediante WB se determinaron los niveles de las proteínas p53, p16<sup>INK4a</sup> y p19<sup>ARF</sup>. Se muestra el WB de 9 clones representativos de cada genotipo. **(B) Análisis cuantitativo de la mutación de p53 y la pérdida de expresión de p16<sup>INK4a</sup> y p19<sup>ARF</sup> en clones de MEFs inmortalizados.** Representación de los porcentajes de mutación de p53 y pérdida de p16<sup>INK4a</sup> y p19<sup>ARF</sup> de los clones inmortalizados de los 3 genotipos y determinación de la significación estadística mediante el test one way anova.

#### 1.4.4. La ausencia de Sph induce una mayor activación de p53 a través de Ppp1ca.

Habíamos observado que la ausencia de Sph se traducía en una reducción de los niveles de Ppp1ca. Está descrito que esta fosfatasa podría intervenir en la regulación de p53 a dos niveles: uno a través de la defosforilación de pRb y la interconexión de esta ruta con la de p53 a través de ARF (7, 162) y otro a través de la defosforilación de p53 (53) y su regulación mediante la unión de Ppp1ca a la proteína p53BP2 (53, 67). Esta posible conexión entre Ppp1ca y p53 nos hizo preguntarnos si la disminución en los niveles de Ppp1ca podría intervenir en el aumento de la respuesta de p53 observado.

Para responder a esta pregunta decidimos repetir los tratamientos con etopósido y 3MC en MEFs Sph (-/-) en los que habíamos mantenido estables los niveles de Ppp1ca. Previo al tratamiento, los MEFs Sph (-/-) fueron infectados con virus que portaban un vector retroviral con el gen de *ppp1ca* (22). Como controles utilizamos MEFs wt y MEFs Sph (-/-) infectados con retrovirus que portaban el vector vacío. De nuevo, los MEFs que no expresaban Sph mostraban unos niveles de p53, basales y posteriores al tratamiento, mayores que en los MEFs wt (Figura 17). Sin embargo, cuando en los MEFs que no expresaban Sph sobreexpresábamos Ppp1ca los niveles de p53 volvían a ser niveles

similares a los mostrados en los MEFs wt (Figura 17). Este resultado indicaba que la disminución de los niveles de Ppp1ca producida por la ausencia de Sph era necesaria para que se produjera el efecto del aumento de la respuesta de p53.



**Figura 17 El aumento de la respuesta de p53 producido por la ausencia de Sph depende de Ppp1ca. Valoración del aumento de p53 por 3MC y etopósido en MEFs sin Sph con sobreexpresión de Ppp1ca.** Infectamos MEFs presenescentes Sph (-/-) con virus que portaban el gen de *ppp1ca* o el vector vacío y como control infectamos los MEFs wt con virus que portaban el vector vacío. Tras la selección, los MEFs se trataron con etopósido y 3MC durante 2 y 6h respectivamente, se recogió proteína total y se estudiaron los niveles de p53. El panel inferior representa la cuantificación de los niveles de p53 referidos al control de carga tubulina. Experimento representativo de 3 experimentos realizados de forma independiente.

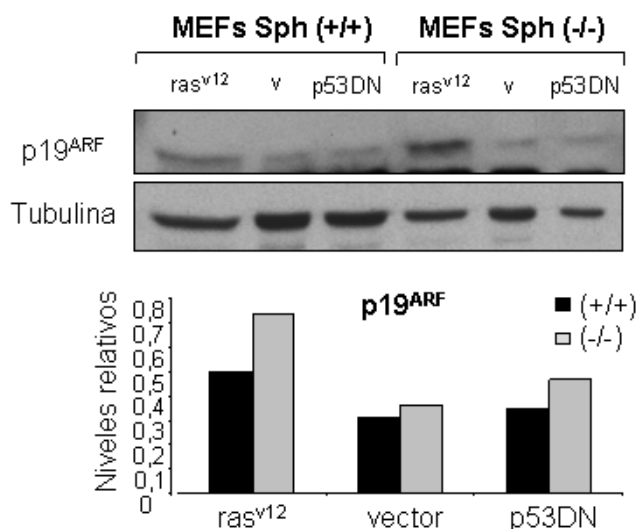
### 1.5. Efecto de la ausencia de Sph sobre ARF.

Se ha descrito que Sph se une al supresor tumoral ARF y que ambas proteínas poseen un efecto aditivo en la supresión del crecimiento (149). Por otro lado, habíamos observado que en ausencia de Sph se reducían los niveles de Ppp1ca, lo que aumentaba el estado hiperfosforilado de pRb. Cuando pRb está hiperfosforilado, E2F queda libre y promueve la transcripción de sus dianas. Se sabe que una de las dianas de E2F es p19<sup>ARF</sup> (7, 162). Por estos dos motivos nos preguntamos si p19<sup>ARF</sup> podría intervenir en el efecto observado en ausencia de Sph: el aumento de la respuesta de p53, ya que p19<sup>ARF</sup> impide la degradación de p53 a través del secuestro de Mdm2.

#### 1.5.1. La ausencia de Sph induce un mayor incremento de p19<sup>ARF</sup> en respuesta al oncogén *ras*.

Esta descrito que el oncogén *ras* induce senescencia prematura en MEFs (129) a través del incremento de p19<sup>ARF</sup> (104). Decidimos estudiar este efecto en los MEFs que no expresaban Sph. Para ello infectamos MEFs presenescentes wt y Sph (-/-) con virus que portaban el oncogén *H-ras*<sup>v12</sup>, el dominante negativo de p53<sup>175H</sup> o el vector vacío. Tras la selección, comprobamos que tanto los MEFs wt como los Sph (-/-) que expresaban el oncogén H-Ras<sup>v12</sup> entraban en senescencia, mientras que los que expresaban el dominante negativo de p53 o el vector vacío continuaban creciendo (datos no mostrados). El análisis de

los niveles de p19<sup>ARF</sup> indicó que los MEFs Sph (-/-) que expresaban el oncogén H-Ras<sup>v12</sup> mostraban unos niveles de p19<sup>ARF</sup> mayores que los wt (Figura 18). Este resultado se correlacionaría con el efecto observado hasta ahora de una mayor activación de p53 en ausencia de Sph y sugeriría que p19<sup>ARF</sup> es un mediador en este proceso.

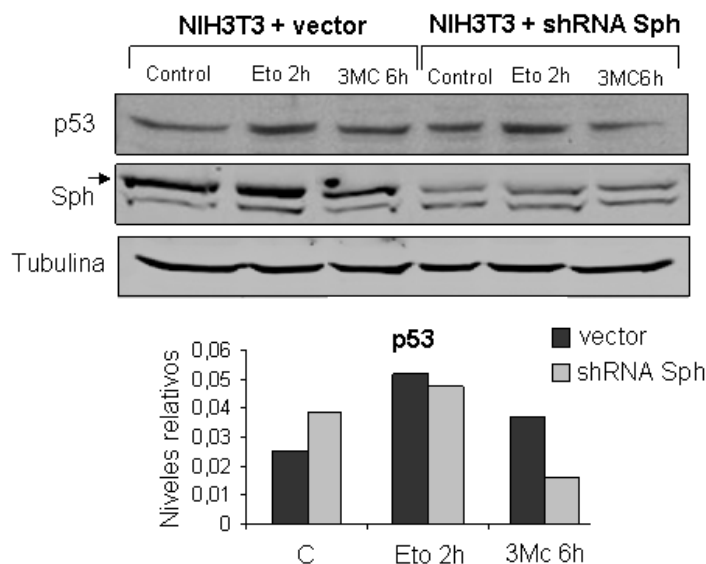


**Figura 18 La ausencia de Sph induce un mayor incremento de p19<sup>ARF</sup> en respuesta al oncogén H-ras<sup>v12</sup>. Valoración de los niveles de p19<sup>ARF</sup> en MEFs sin Sph expresando el oncogén H-ras<sup>v12</sup>.** MEFs wt y Sph (-/-) presenescentes fueron infectados con virus que portaban el oncogén H-ras<sup>v12</sup>, o el dominante negativo de p53, p53<sup>175H</sup> (p53DN) o el vector vacío (v). Tras la selección, se recogió proteína total y se estudiaron los niveles de p19<sup>ARF</sup> mediante WB. El panel inferior representa la cuantificación de los niveles de p19<sup>ARF</sup> referidos al control de carga tubulina. Experimento representativo de 3 experimentos realizados independientemente.

### 1.5.2. La ausencia de Sph induce una mayor activación de p53 a través de p19<sup>ARF</sup>.

Puesto que p19<sup>ARF</sup> podía estar mediando la mayor activación de p53 en ausencia de Sph, decidimos comprobar si la ausencia de Sph producía el mismo efecto en una línea celular que no expresara p19<sup>ARF</sup>. Para ello transfectamos células NIH3T3, que tienen una deleción en el locus *INK4* habiendo perdido p19<sup>ARF</sup>, con un vector que expresaba el shRNA 2 frente a *sph* o vector vacío como control. Tras la selección, tratamos las células con etopósido y 3MC y estudiamos los niveles de p53. Observamos que, en este caso, la ausencia parcial de Sph no aumentaba la activación de p53 (Figura 19), aunque si producía otros efectos como la recuperación temprana del crecimiento tras la retirada del suero y el aumento de la proliferación (datos no mostrados). Con estos datos pudimos concluir que la presencia de p19<sup>ARF</sup> era necesaria para que la ausencia de Sph produjera el efecto de la mayor activación de p53, pero no era necesaria para que la ausencia de Sph produjera un aumento en la proliferación. Esto sugería también que p19<sup>ARF</sup> y p53 estaban por debajo de pRb en la ruta de señalización iniciada por la ausencia de Sph.





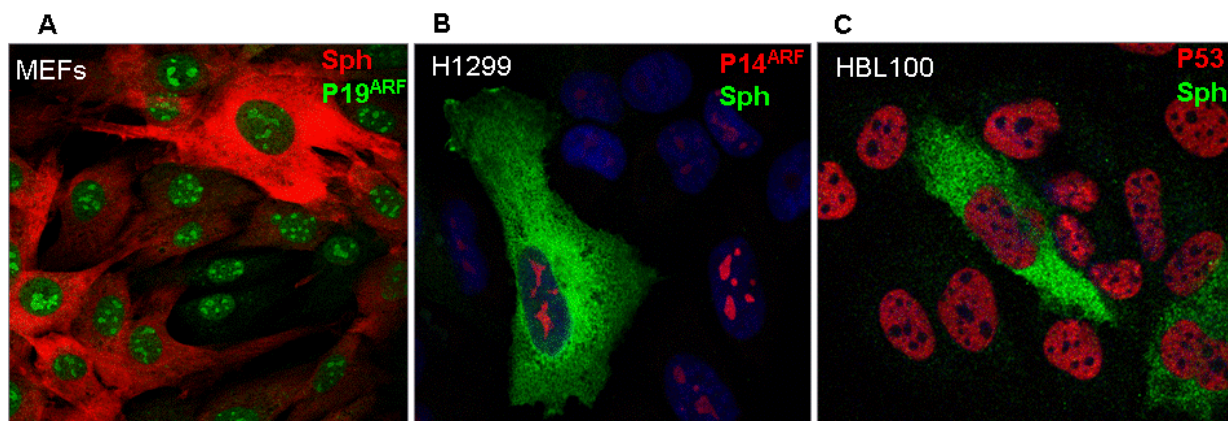
**Figura 19 La ausencia de Sph necesita de la presencia de p19<sup>ARF</sup> para inducir una mayor activación de p53. Valoración del aumento de p53 por etopósido y 3MC en NIH3T3 con niveles reducidos de Sph.** Transfectamos NIH3T3 con el shRNA frente a *sph* (el sh2) (shRNA Sph) o con vector vacío (vector). Tras la selección, tratamos con etopósido 100μM y 3MC 10μM durante 2 y 6h respectivamente, recogimos proteína total y estudiamos, mediante WB, los niveles de p53. El panel inferior representa la cuantificación de los niveles de p53 referidos al control de carga tubulina. Experimento representativo de 3 experimentos realizados de forma independiente.

### 1.5.3. Sph no colocaliza con ARF ni con p53.

Aunque está descrita la unión de Sph con ARF a través del dominio C-terminal coiled-coil de Sph y la localización de ambas proteínas en el núcleo (149), quisimos comprobar si dicha localización nuclear se traducía en la colocalización de ambas proteínas. Además, quisimos comprobar si existía colocalización entre Sph y p53. Para ello utilizamos células de ratón (MEFs wt) y células humanas (H1299 p53 (-/-) y HBL100 p53 wt). No conseguimos que el anticuerpo frente a Sph funcionara en inmunofluorescencia, por tanto infectamos las células con el ADN codificante del extremo C-terminal de *sph* (del aminoácido 296 al 817) etiquetado con el dominio HA. Utilizamos el extremo C-terminal de Sph porque estaba descrito que la región necesaria para su localización nuclear comprendía los aminoácidos 552-813 y la región implicada en la unión a ARF comprendía los aminoácidos 605-726 (149).

Realizamos tinciones inmunofluorescentes en las tres líneas generadas para ver Sph y p19<sup>ARF</sup> en la línea murina, y Sph y p14<sup>ARF</sup> o Sph y p53 en las líneas humanas. Mediante microscopia confocal (Figura 20) se observó que Sph se localizaba principalmente en el citoplasma, confirmando los datos de inmunocitoquímica donde se identificó la proteína Sph completa en MEFs (Figura 6C). Nuestros datos mostraban que Sph no colocalizaba ni con ARF, ni con p53. Lo que indicaba que la relación de Sph con estas dos proteínas era funcional pero no física.





**Figura 20 Sph no colocaliza con ARF ni con p53. Valoración mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal de la localización de Sph, ARF y p53.** Se utilizaron células de ratón: MEFs (A) y células humanas: H1299 (B) y HBL100 (C) infectadas con virus que portaban el ADNc del extremo C-terminal de la proteína Sph. Para la visualización de Sph se utilizó un anticuerpo primario monoclonal contra HA y un secundario anti-ratón Alexa 633 (A) o 488 (B y C). Para la visualización de p19<sup>ARF</sup> se utilizó un anticuerpo primario policlonal frente a p19<sup>ARF</sup> y uno secundario anti-conejo Alexa 488 (A). Y para la visualización de p14<sup>ARF</sup> y p53, se utilizaron anticuerpos primarios policlonales frente a p14<sup>ARF</sup> y p53 y secundarios anti-conejo Alexa 633 (B y C).

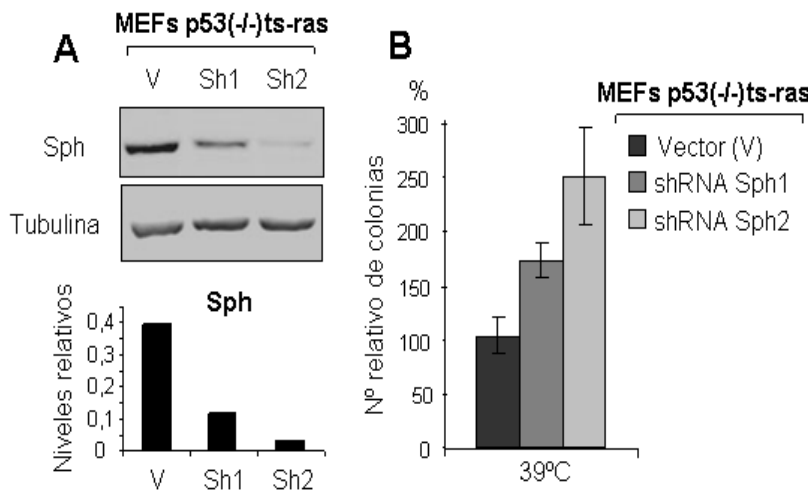
## 1.6. Sph como supresor tumoral en modelos celulares.

El siguiente paso fue estudiar el papel de la ausencia de Sph en la progresión tumoral *in vitro*.

### 1.6.1. La ausencia de Sph, en ausencia de p53, aumenta algunas propiedades tumorales.

En apartados anteriores observamos que la ausencia de Sph en presencia de p53 producía activación de la ruta de p53. Por este motivo, nos planteamos qué efecto produciría la ausencia de p53 en respuesta a la pérdida de Sph. Para estudiar este efecto decidimos estudiar algunas propiedades tumorigénicas subrogadas en dos modelos celulares: en MEFs p53(-/-)ts-ras que expresaban establemente el shRNA frente a *sph* (ver apartado 1.3.3 y 1.4.1) y en MEFs Sph (-/-) immortalizados y que por tanto presentaban *p53* mutado (ver apartado 1.4.3).

Utilizamos los MEFs p53(-/-)ts-ras que expresaban establemente el shRNA frente a *sph* para hacer un ensayo de clonabilidad a la temperatura restrictiva (39°C), a la cual p53 se expresaba de forma mutada. Con este ensayo medimos la capacidad de las células de evadir apoptosis en ausencia de contacto celular. Para ello se sembraron las células a densidad muy baja (10.000 células por placa de 10cm) y se dejaron crecer hasta formar colonias (10 días). Observamos que las células que expresaban el shRNA frente a *sph* formaban significativamente más colonias que las que expresaban el vector vacío (Figura 21B). Este aumento correlacionaba con los niveles reducidos de Sph.

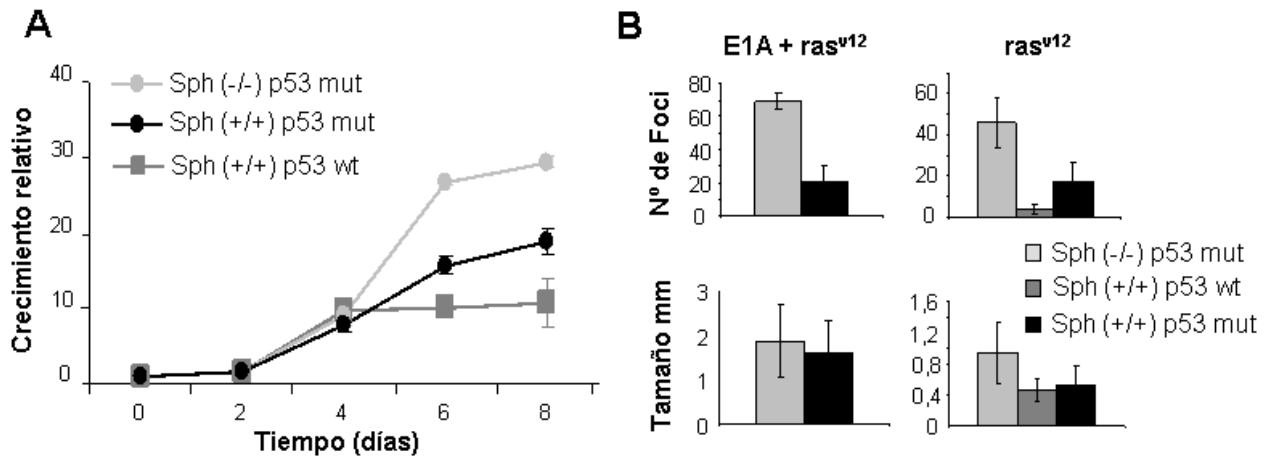


**Figura 21** La ausencia de Sph, en ausencia de p53, aumenta la capacidad de formación de colonias. **(A)** Valoración de la eficacia de los shRNA frente a *sph*. Se infectaron MEFs p53(-/-)ts-ras con virus que portaban dos shRNA frente a *sph* de ratón (sh1 y sh2) o el vector vacío (v), se seleccionaron, se recogió proteína total y se estudiaron los niveles de Sph. En el panel inferior se representa la cuantificación de los niveles de Sph referidos al control de carga tubulina. **(B)** Ensayo de clonabilidad en MEFs con p53 inactivado y niveles reducidos de Sph. Los MEFs p53(-/-)ts-ras seleccionados para la expresión de los shRNA de Sph o de vector vacío se sembraron en baja densidad y se mantuvieron a 39°C durante 10 días. Se cuantificó el número de colonias y se representó la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar.

Estos datos sugerían que Sph podía comportarse como un supresor tumoral en ausencia de actividad de p53.

Para confirmar estos resultados, utilizamos MEFs Sph (-/-) inmortalizados (con *p53* mutado) para realizar una curva de crecimiento y así medir si la ausencia de Sph producía alguna variación en la capacidad de crecimiento. Observamos que los MEFs que no expresaban Sph crecían más rápido que los MEFs wt, tanto si estos expresaban *p53* wt como *p53* mutado (Figura 22A). Esta propiedad de las células que no expresaban Sph se observó también en MEFs presenescentes con *p53* wt (datos no mostrados). Además, utilizamos los MEFs Sph (-/-) inmortalizados para infectarlos con retrovirus que portaban el oncogén *H-ras*<sup>v12</sup> o los oncogenes *H-ras*<sup>v12</sup> y *E1A* para medir su efecto oncogénico en ausencia de Sph. Como propiedad biológica, medimos la capacidad de crecer independientemente del anclaje. Para ello utilizamos un ensayo de formación de colonias en agar blando. Las células infectadas y seleccionadas se sembraron en una matriz de agar blando y se dejaron crecer durante 4 semanas. La cuantificación, tanto del número de colonias como del tamaño de las mismas, mostró que la ausencia de Sph aumentaba el crecimiento en agar blando en los MEFs inmortalizados que expresaban el oncogén *H-ras*<sup>v12</sup> o los oncogenes *H-ras*<sup>v12</sup> y *E1A* (Figura 22B).

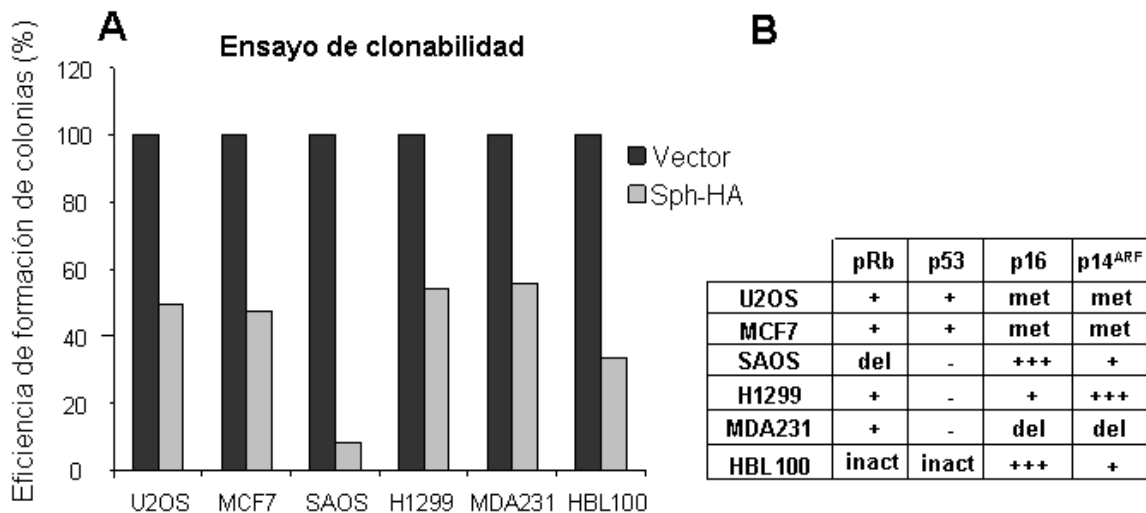
Sin embargo, la ausencia de Sph en presencia de *p53* mutado, no aumentaba otras propiedades tumorigénicas medidas por otros ensayos como el ensayo de migración por cierre de una herida, el ensayo de crecimiento en ausencia de factores de crecimiento o el ensayo de densidad de saturación (datos no mostrados).



**Figura 22 La ausencia de Sph aumenta algunas propiedades tumorales celulares. (A) Curva de crecimiento de MEFs inmortalizados.** Se realizó una curva de crecimiento con MEFs inmortalizados Sph (-/-) con *p53* mutado, Sph wt con *p53* mutado y Sph wt con *p53* wt como se describe en M&M. El crecimiento celular relativo hace referencia a la relación entre el crecimiento en ese día con respecto a la misma población celular a día 0. Se representó la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. **(B) Ensayo de formación de colonias en agar blando.** Se utilizaron MEFs inmortalizados Sph (-/-) con *p53* mutado, Sph wt con *p53* mutado y Sph wt con *p53* wt, que expresaban establemente el oncogén *H-ras<sup>v12</sup>* o los oncogenes *H-ras<sup>v12</sup>* y *E1A*. Tras un mes de crecimiento, se fijaron, se tiñeron, y se realizaron fotos. Se cuantificó el número de colonias y el tamaño de las mismas, que se determinó como la media del diámetro de 30 colonias representativas. Se representó la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. Experimentos representativos de 4 experimentos realizados de forma independiente.

### 1.6.2. La sobreexpresión de Sph produce supresión del crecimiento.

Si la ausencia de un supresor tumoral favorece las propiedades tumorales celulares, la sobreexpresión generalmente favorece la supresión de las mismas. Por este motivo decidimos estudiar cuál sería el efecto de la sobreexpresión de Sph en diferentes líneas celulares tumorales humanas. Como hemos observado que la ausencia de Sph favorece algunas propiedades tumorales sólo en ausencia de *p53*, decidimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de Sph en líneas con *p53* mutado y wt. Para ello transfectamos estas líneas con un vector que expresaba el gen de *sph* etiquetado con HA o con un vector vacío y se realizó un ensayo de clonabilidad para medir la capacidad de crecimiento. Observamos que las células que sobreexpresaban Sph formaban menor número de colonias que las células que expresaban el vector vacío (Figura 23A). Además, este efecto se producía independientemente del estado de pRb, *p53*, *p16<sup>INK4a</sup>* y *p14<sup>ARF</sup>*, ya que cada una de estas líneas presentaba unas características diferentes respecto a estos cuatro supresores tumorales (Figura 23B) y en todas ellas la sobreexpresión de Sph producía la supresión del crecimiento. Esto indicaba que Sph podría ejercer su efecto de supresión del crecimiento a diferentes niveles.

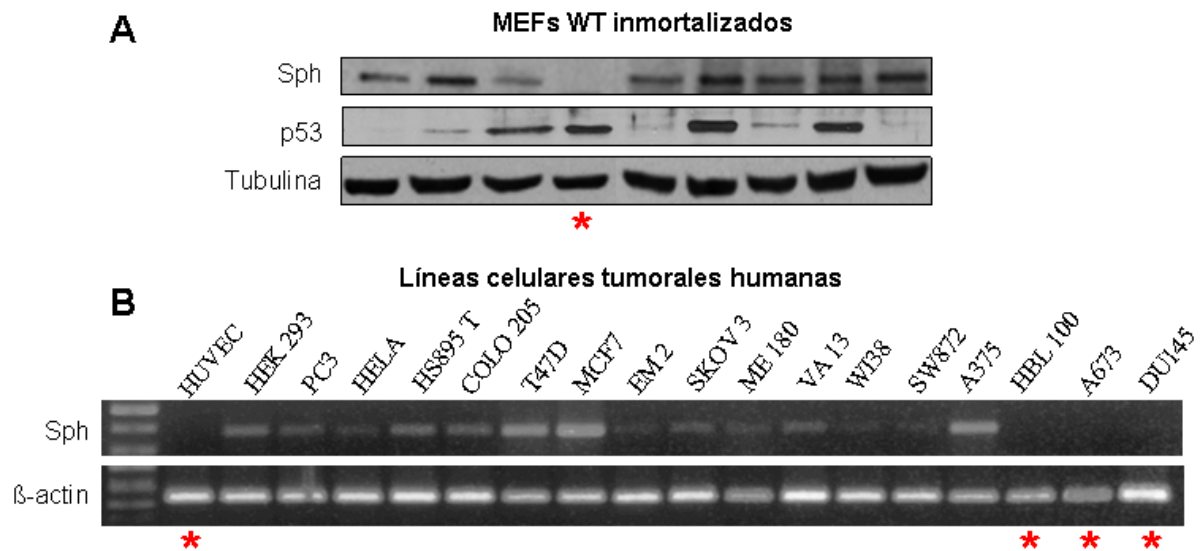


**Figura 23 La sobreexpresión de Sph suprime el crecimiento en diferentes líneas celulares tumorales humanas. (A) Ensayo de formación de colonias tras la expresión ectópica de Sph en líneas celulares tumorales humanas.** Las diferentes líneas celulares (U2OS, MCF7, SAOS, H1299, MDA231 y HBL100) fueron transfectadas con un vector que expresaba el ADNc de *sph-HA* o con el vector vacío. Las células se sembraron en baja densidad y se dejaron crecer hasta la formación de colonias. En ese momento se fijaron tanto las células control como las que sobreexpresaban Sph, se tiñeron y se cuantificaron las colonias. El número de colonias formadas por las células que expresaban el vector vacío se tomó de referencia (100%) y el número de colonias formadas por las células que sobreexpresaban Sph se refirió al 100%. Se representa la media de tres experimentos independientes. **(B) Características de las líneas celulares respecto a los supresores tumorales pRb, p53, p16<sup>INK4a</sup> y p14<sup>ARF</sup>.** Tabla en la que se resume el estado de los supresores tumorales pRb, p53, p16<sup>INK4a</sup> y p14<sup>ARF</sup> en todas las líneas celulares tumorales humanas utilizadas. El estado se describe como wt (+), aumento de la expresión (+++) pérdida de expresión por mutación (-), pérdida de expresión por metilación (met), pérdida de expresión por delección (del) o inactivación por presencia de SV40 (inact).

### 1.6.3. La expresión de Sph se pierde en líneas celulares.

Una característica de los genes que actúan como supresores tumorales es su inactivación en las células tumorales, de manera que se favorezca la transformación celular. Como nuestro objetivo era saber si *Sph* se podía comportar como un supresor tumoral, quisimos comprobar si se perdía su expresión durante la immortalización celular o en líneas celulares tumorales humanas. Para ello analizamos la expresión de Sph a nivel proteico en nueve de los clones inmortales obtenidos a partir de MEFs wt (Figura 24A) y observamos que uno de los clones había perdido la expresión de la proteína Sph. Como era de esperar, este clon también había mutado *p53* en el proceso de immortalización. También analizamos la expresión de *Sph* a nivel de ARNm en dieciocho líneas celulares tumorales humanas (Figura 24B) y observamos que cuatro de esas líneas (el 22%) habían perdido la expresión de *Sph*. El análisis de proteína Sph de otro panel de líneas celulares tumorales humanas mostró que sólo EM2, una línea celular de leucemia mieloide crónica, había perdido completamente la expresión de Sph a nivel de proteína, aunque en un porcentaje significativo se observaron niveles de proteína muy reducidos (datos no mostrados). Estos datos sugerían que Sph podía comportarse como un supresor tumoral. Además el hecho de

que EM2 mantenga ARNm de *Sph* sugiere la existencia de diversos mecanismos para inactivar *Sph*.



**Figura 24 Pérdida de expresión de *Sph* en clones de MEFs inmortalizados y en líneas celulares tumorales humanas. (A) Valoración de la expresión de proteína *Sph* en clones de MEFs inmortalizados.** Estudio mediante WB de los niveles proteicos de *Sph* en nueve de los clones inmortales obtenidos a partir de MEFs wt (ver apartado 1.4.3). **(B) Valoración de la expresión del ARNm de *Sph* en líneas celulares tumorales humanas.** Estudio de los niveles de ARNm mediante RT-PCR en 18 líneas celulares tumorales humanas. Se resaltan con un asterisco rojo los casos que han perdido la expresión de *Sph*. Experimento repetido 3 veces con idénticos resultados.

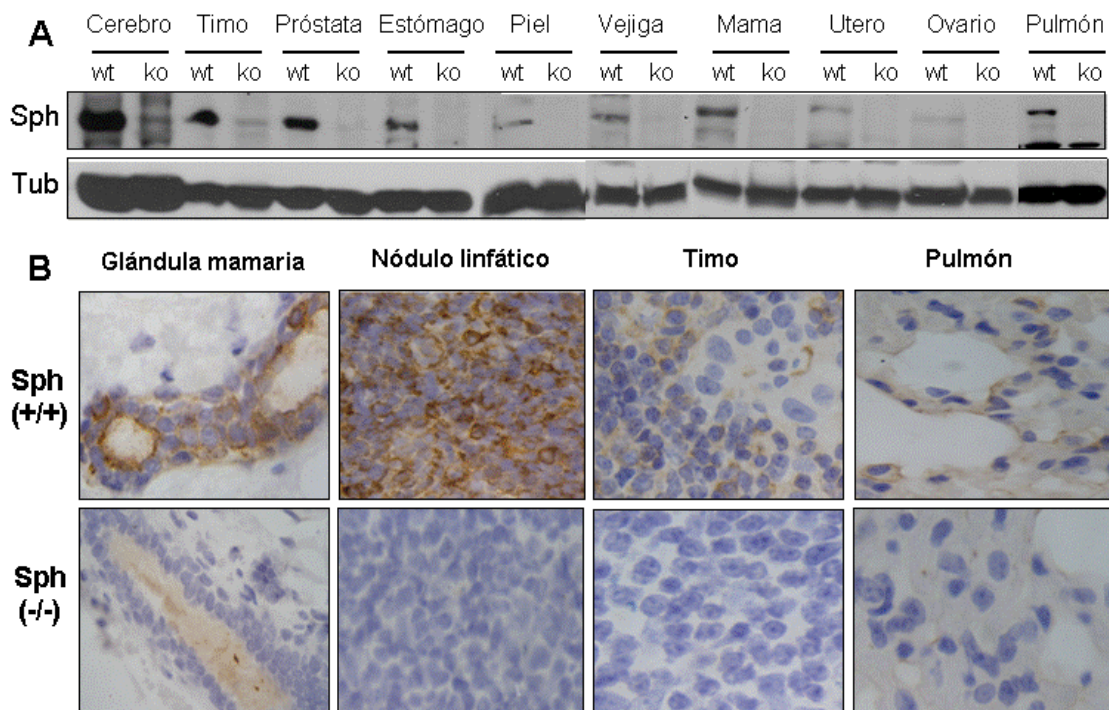


## 2. Sph como supresor tumoral en modelos animales.

Después de concluir que Sph se comportaba como un supresor tumoral *in vitro*, quisimos comprobar si tenía el mismo efecto *in vivo*. Para comprobarlo decidimos utilizar la línea de ratones Knock-out para *sph* (Sph KO) (48). Con el fin de determinar si existía cooperación entre la ausencia de Sph y otras alteraciones con potencial tumoral, se generaron líneas dobles a partir del cruce de la línea Sph KO con otras líneas que portaban la inactivación constitutiva de p53 o la activación constitutiva de Akt.

### 2.1. Caracterización de los ratones Sph KO.

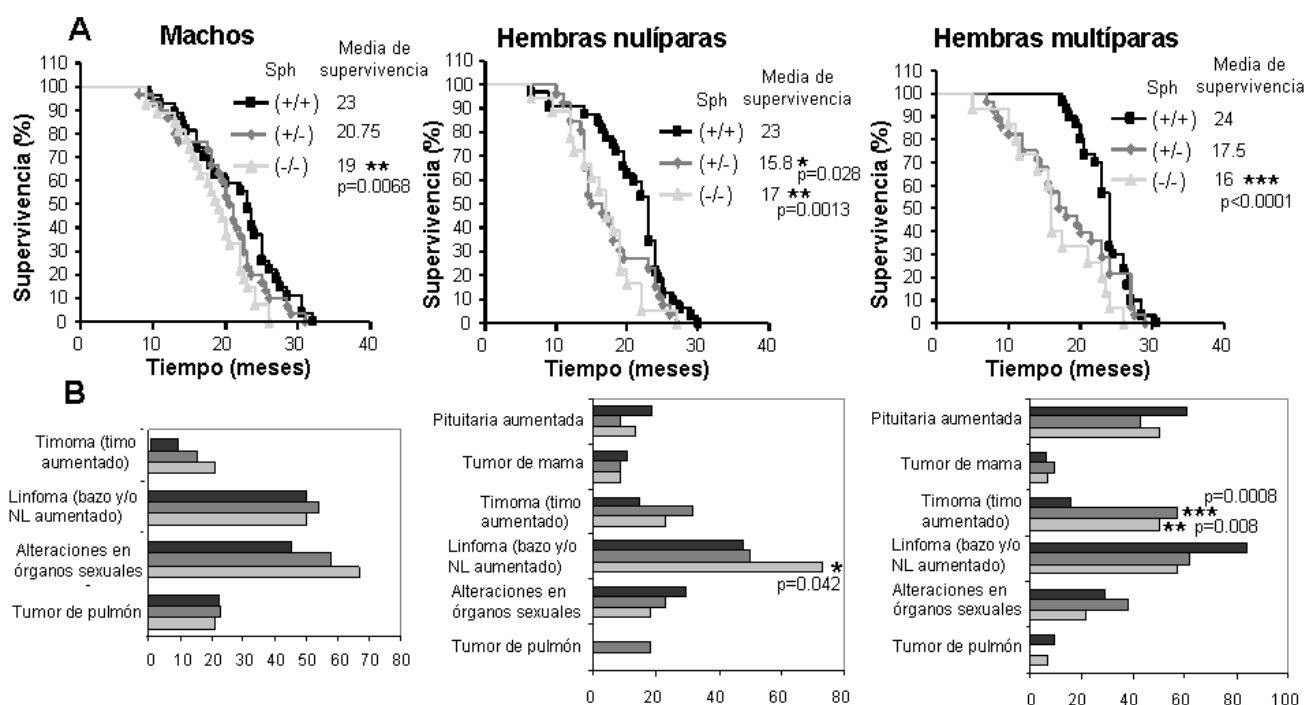
Antes de estudiar el fenotipo de la línea que portaba la delección del exón 1 de *sph* (Sph KO) (48), quisimos valorar la expresión de Sph y comprobar la extensión del Knock-out en diferentes tejidos (Figura 25). En individuos normales Sph muestra una expresión ubicua con especial preponderancia en cerebro. En la figura 25 se muestran algunos ejemplos de tejidos donde se observa la pérdida de expresión de la proteína Sph. En todos los tejidos analizados se observó una pérdida completa de Sph, excepto en cerebro y timo donde aún se detectaba una expresión residual de Sph.



**Figura 25 Caracterización de la ausencia de Sph en ratones Sph (-/-).** (A) Valoración de los niveles de Sph en determinados tejidos de ratones wt y Sph (-/-) KO. Se recogieron muestras de diferentes tejidos de ratones wt y Sph (-/-) (ko), se lisaron, se cuantificaron y se analizaron los niveles de Sph mediante WB. (B) Caracterización inmunohistoquímica de Sph en diferentes tejidos de ratón. Se recogieron muestras de diferentes tejidos de ratones wt y Sph (-/-), se hicieron bloques de parafina, cortes y tinciones inmunohistoquímicas para Sph. Se muestran fotos representativas de tinciones de 4 tejidos.

## 2.2. Estudio fenotípico de las colonias de animales defectivos para la expresión de Sph.

Obtuvimos colonias experimentales de machos, hembras nulíparas y hembras múltiparas (con 4 partos) ( $n= 20-30$  por genotipo). Seguimos la evolución de todos los animales hasta que mostraron signos de enfermedad, en ese momento fueron sacrificados y se realizó la necropsia anotando la edad de muerte, todas las alteraciones macroscópicas observadas y recogiendo muestras de determinados tejidos (ver M&M). En el análisis de la supervivencia de las colonias experimentales (Figura 26A) observamos que en todos los casos los ratones que no expresaban Sph mostraban una media de supervivencia menor. En los machos se reducía en 4 meses respecto al wt, y en las hembras nulíparas y múltiparas se reducía en 6 y 8 meses respectivamente. En los tres casos la diferencia era estadísticamente significativa ( $p<0.01$ ).



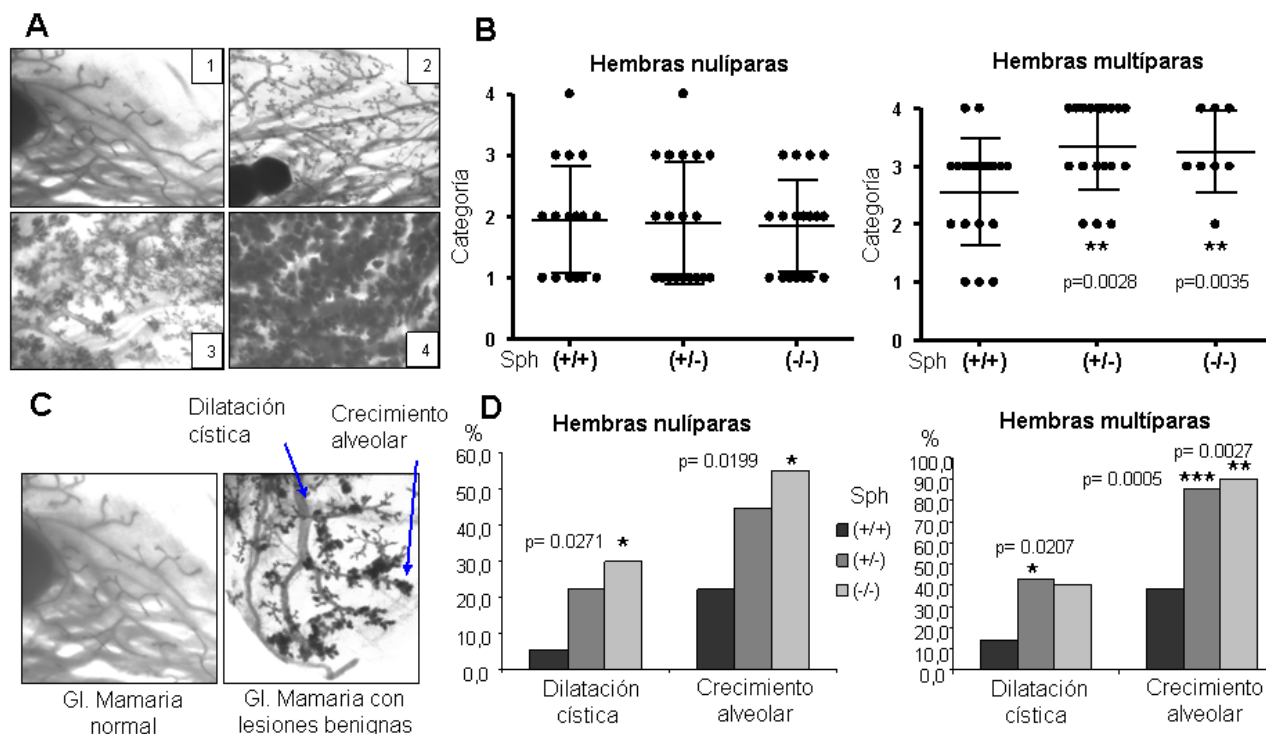
**Figura 26 La ausencia de Sph reduce la media de supervivencia y aumenta la incidencia de linfomas y timomas en hembras. (A) Supervivencia de ratones heterocigotos y homocigotos para *sph*.** Curvas de supervivencia de las colonias experimentales de machos, hembras nulíparas y hembras múltiparas (con 4 partos) de entre 20 y 30 ratones por genotipo. La significación estadística se determinó mediante un test Chi cuadrado. **(B) Causas macroscópicas de muerte.** Representación gráfica de los porcentajes de alteraciones macroscópicas encontradas en los ratones sacrificados. Se determinó la significación estadística mediante un test T de Student, refiriendo los porcentajes de alteración en cada órgano a los porcentajes de alteración en el mismo órgano en ratones wt. Valores de  $p<0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p<0.05$  (\*),  $p<0.01$  (\*\*) y  $p<0.001$  (\*\*\*).

El análisis de las alteraciones macroscópicas encontradas en las necropsias mostró que las únicas diferencias significativas entre genotipos eran los linfomas en las hembras Sph (-/-) nulíparas y los timomas en las hembras Sph (-/-) múltiparas (Figura 26B). Esto

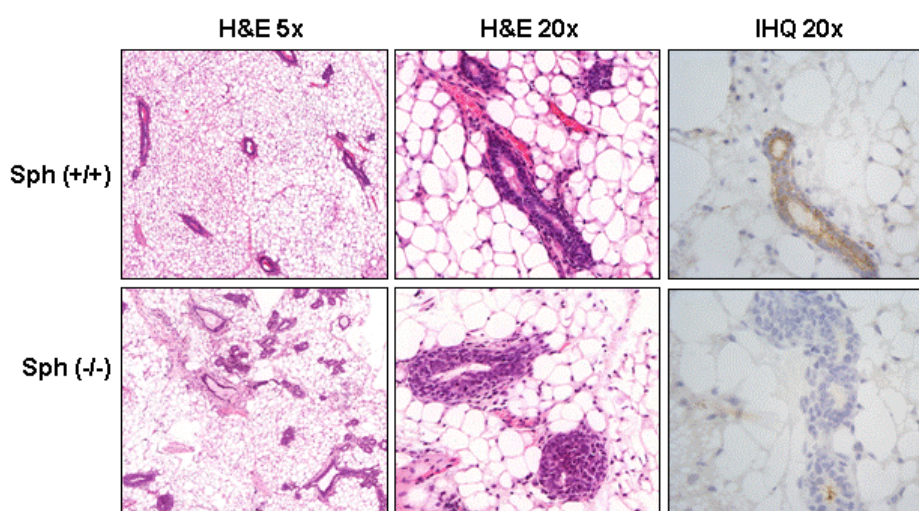
sugería una mayor preponderancia de linfomas y/o timomas en ratones Sph (-/-). Estos dos tejidos expresan Sph en individuos wt por lo que su alteración podría explicarse en ratones Sph (-/-). Además, observamos un ligero aumento en alteraciones en otros órganos. Es muy probable que la ausencia de Sph produzca alteraciones tumorales en múltiples órganos en diferentes animales, cuya suma produzca la disminución de la supervivencia observada. De cualquier manera, sería necesario un estudio histopatológico más completo de los distintos órganos para obtener datos más precisos sobre la causa de la muerte y así poder concluir el motivo por el cual la ausencia de Sph reduce la media de supervivencia.

Por otro lado, quisimos centrarnos en el estudio de un tejido en particular, la glándula mamaria, que en individuos normales muestra altos niveles de proteína Sph (Figura 25). Además, es un tejido en el que se pueden observar y cuantificar fácilmente lesiones benignas como la dilatación cística o el crecimiento alveolar, las cuales dan una idea de la susceptibilidad de un tejido de formar lesiones tumorales. Para estudiar el epitelio mamario extrajimos las mamas de cada una de las hembras sacrificadas, tanto de las nulíparas como de las multíparas. Una de las mamas fue teñida con rojo carmín y del resto se obtuvieron bloques de parafina, cortes y tinciones de hematoxilina y eosina. Entre las mamas teñidas con rojo carmín, se estableció una categoría de cuatro niveles de menos a más proliferante (Figura 27A). Las mamas de todas las hembras de las colonias experimentales fueron clasificadas, de acuerdo a su apariencia, en uno de estos cuatro niveles. Con estos datos se hizo una representación gráfica y se determinó su significación estadística. Observamos que en las hembras multíparas heterocigotas, Sph (+/-), y homocigotas, Sph (-/-), el número de mamas pertenecientes a la categoría más proliferante (categoría 4) era mayor y esta diferencia era estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) (Figura 27B). Si bien este efecto no era apreciable en hembras nulíparas. Además, cuantificamos el porcentaje de mamas que presentaban dilatación cística y crecimiento alveolar (Figura 27C) y determinamos mediante un test T de Student la significación estadística. Observamos que en las hembras nulíparas Sph (-/-) y en las hembras multíparas, tanto en las Sph (+/-) como en las Sph (-/-), aumentaba significativamente el porcentaje de mamas con estas dos lesiones benignas (Figura 27D). Este fenotipo de mayor proliferación en el epitelio mamario y mayor número de lesiones benignas también se observó cuando realizamos tinciones de hematoxilina y eosina, se observó un mayor número de capas celulares por ducto y más dilatación cística (Figura 28). Este fenotipo en el epitelio mamario apoyaba la teoría de que la ausencia de Sph aumentaba la capacidad proliferativa de las células, lo que se traducía en un fenotipo más proliferante y con más lesiones benignas.





**Figura 27 La ausencia de Sph favorece un fenotipo mamario más proliferante y aumenta el porcentaje de lesiones benignas. (A) Clasificación del estado proliferativo del epitelio mamario en ratones.** Se estableció una clasificación de 4 categorías, de menos a más proliferante, en función de la apariencia que presentase la tinción de rojo carmín de la mama. **(B) Cuantificación del fenotipo mamario en diferentes cohortes de hembras heterocigotas (+/-) y homocigotas (-/-) para sph.** Cada mama de cada hembra nulípara y multipara fue clasificada en una de las 4 categorías establecidas en A. La asignación de la categoría se hizo de forma "ciega". La determinación de la significación estadística se realizó mediante un test T de Student. **(C) Valoración macroscópica de lesiones mamarias benignas.** Ejemplo de una glándula mamaria con apariencia normal y otra con dilatación cística y crecimiento alveolar marcados con flechas. **(D) Análisis cuantitativo de la presencia de lesiones benignas en la glándula mamaria de hembras nulíparas y multiparas heterocigotas (+/-) y homocigotas (-/-) para sph.** Se determinó el porcentaje de mamas de cada genotipo que presentaban lesiones benignas como la dilatación cística y el crecimiento alveolar. Se representó dicho porcentaje y se determinó la significación estadística mediante un test T de Student. Valores de  $p<0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p<0.05$  (\*),  $p<0.01$  (\*\*) y  $p<0.001$  (\*\*\*).



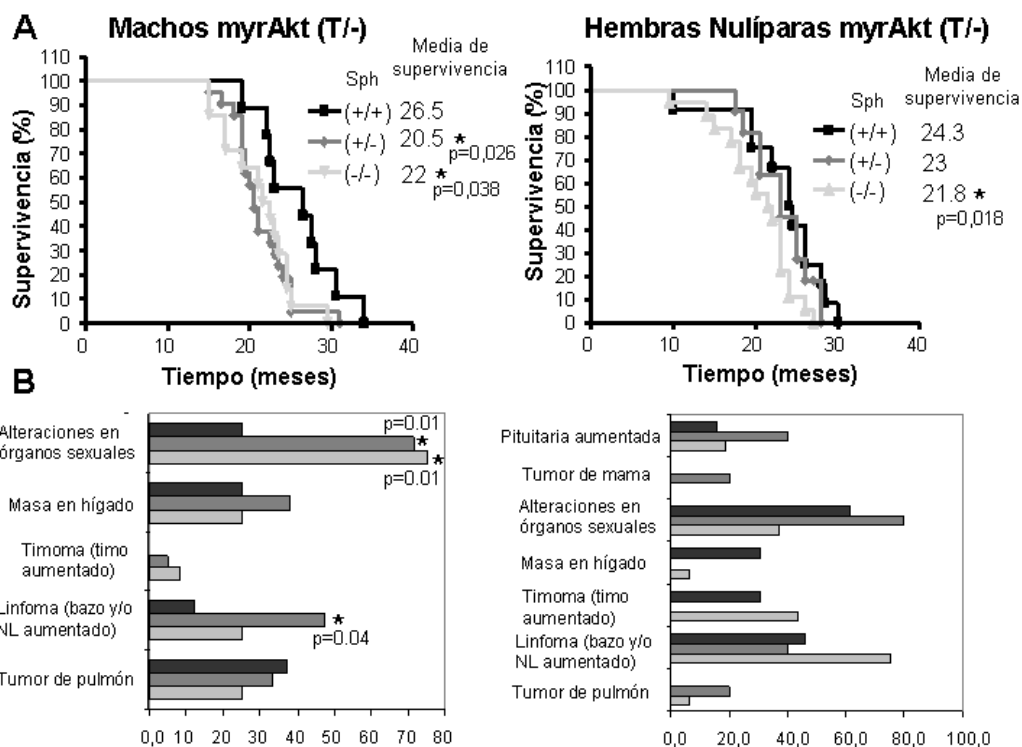
**Figura 28 La ausencia de Sph favorece un fenotipo mamario más proliferante y con más lesiones benignas. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E) e inmunohistoquímica para Sph (IHQ) del epitelio mamario de hembras nulíparas Sph (+/+) y Sph (-/-).** Se muestran fotos representativas del epitelio mamario de hembras nulíparas Sph (+/+) y Sph (-/-), se muestran tinciones de H&E a dos aumentos diferentes (5x y 20x) y tinciones IHQ para Sph (20x).

### 2.3. La ausencia de Sph coopera con la activación de Akt.

Después de analizar el efecto de la ausencia de Sph en la supervivencia y en la incidencia de determinados tumores, quisimos comprobar si además cooperaba con la activación constitutiva de Akt. Para determinar si existía dicha cooperación, decidimos cruzar los ratones que portaban la inactivación constitutiva de Sph (Sph KO) con los ratones transgénicos que expresaban en el epitelio mamario (bajo un promotor MMTV) *Akt1* modificado con una señal de miristilación del gen *src* (*myrAkt*), la cual activa constitutivamente a la proteína al localizarla en la membrana plasmática. Aunque las hembras transgénicas *myrAkt* no desarrollan tumores mamarios espontáneos, muestran una mayor incidencia de lesiones benignas, un retraso en la involución mamaria y una mayor susceptibilidad a la formación de carcinomas de mama inducidos por el carcinógeno DMBA (11).

Obtuvimos colonias experimentales de 20 animales de cada genotipo doble combinando diferentes niveles de Sph en fondos *myrAkt*: Sph(+/+);*myrAkt*(T/-), Sph(+/-);*myrAkt*(T/-), y Sph(-/-);*myrAkt*(T/-), tanto de machos como de hembras núlparas. Seguimos la evolución de todos los animales hasta que mostraron signos de enfermedad, en ese momento fueron sacrificados y se procedió a su estudio. En el análisis de la supervivencia observamos que las cohortes que expresaban *myrAkt* en un fondo sin Sph mostraban una media de supervivencia menor que las que sólo expresaban el transgén (Figura 29A). En los machos se reducía en 4.5 meses respecto al control, y en las hembras núlparas se reducía en 2.5 meses. Y en los dos casos, la diferencia era estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

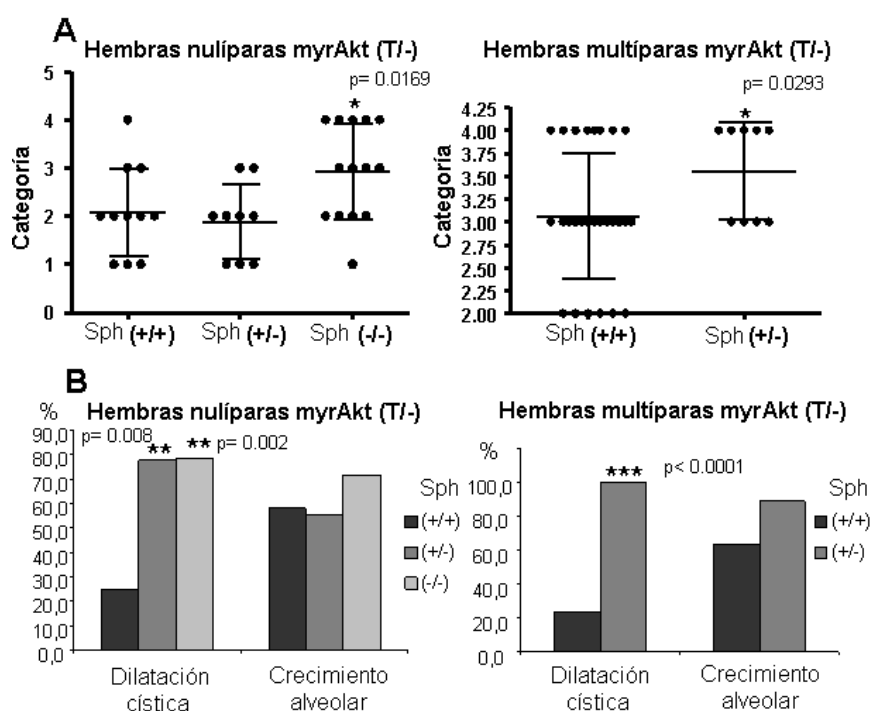
Al estudiar las alteraciones macroscópicas encontradas en las necropsias observamos que las únicas diferencias destacables entre genotipos eran las alteraciones en los órganos sexuales de los machos Sph(+/-);*myrAkt*(T/-) y Sph(-/-);*myrAkt*(T/-) ( $p = 0.01$ ) (Figura 29B). Esto sugería una mayor preponderancia de alteraciones en órganos sexuales en ratones expresando el transgén *myrAkt* que no expresan Sph (Sph(-/-);*myrAkt*(T/-)). Estos tejidos de órganos sexuales, tanto en machos como en hembras, son diana del promotor MMTV y por tanto expresarían el transgén *myrAkt* (11) explicando una posible cooperación. Sin embargo, observamos también un ligero aumento en alteraciones en otros órganos. Es muy probable que la ausencia de Sph produzca alteraciones tumorales en múltiples órganos en diferentes animales, cuya suma produzca la disminución de la supervivencia observada. De cualquier manera, sería necesario un estudio histopatológico más completo de los distintos órganos para determinar la causa de la muerte y así poder concluir de forma más precisa el motivo por el cual la ausencia de Sph coopera con la presencia del transgén *myrAkt* reduciendo la media de supervivencia.



**Figura 29** La ausencia de Sph reduce la media de supervivencia en ratones transgénicos myrAkt y aumenta el número de alteraciones en órganos sexuales en machos. **(A)** Supervivencia de ratones heterocigotos y homocigotos para *sph* que expresan el transgén *myrAkt*. Curvas de supervivencia de las colonias experimentales de machos y hembras nulíparas, de 20 ratones por genotipo. La significación estadística se determinó mediante un test Chi cuadrado. **(B)** Causas macroscópicas de muerte. Representación gráfica de los porcentajes de alteraciones encontradas en los ratones sacrificados. Se determinó la significación estadística mediante un test T de Student, refiriendo los porcentajes de alteración en cada órgano a los porcentajes de alteración en el mismo órgano en ratones wt. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Puesto que tanto la línea Sph KO como la línea transgénica myrAkt presentan un fenotipo de mayor incidencia de lesiones benignas en el epitelio mamario (apartado 2.2 y (11)) quisimos estudiar si en la línea doble existía cooperación y aumentaba la incidencia de dichas lesiones. Para estudiar el epitelio mamario se procedió de la misma manera que con la línea Sph KO (apartado 2.2). Las mamas de todas las hembras de las colonias experimentales fueron clasificadas, según su apariencia, en uno de los cuatro niveles de la categoría establecida (Figura 27A), con los datos obtenidos se hizo una representación gráfica y se determinó su significación estadística mediante un test T de Student. Observamos que en las hembras nulíparas Sph(-/-);myrAkt(T/-) y en las hembras múltiparas Sph(+/-);myrAkt(T/-) el número de mamas pertenecientes a la categoría más proliferante (categoría 4) era mayor y esta diferencia era estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 30A). Además, cuantificamos el porcentaje de mamas que presentaban dilatación cística y crecimiento alveolar y determinamos mediante un test T de Student la significación estadística. Observamos que en las hembras Sph(+/-);myrAkt(T/-) y Sph(-/-);myrAkt(T/-) nulíparas ( $p < 0.01$ ) y en las Sph(+/-);myrAkt(T/-) múltiparas ( $p < 0.001$ ) aumentaba significativamente el porcentaje de mamas con dilatación cística (Figura 30B). Este fenotipo

en el epitelio mamario apoyaba la teoría de que la ausencia de Sph cooperaba con la activación de Akt.



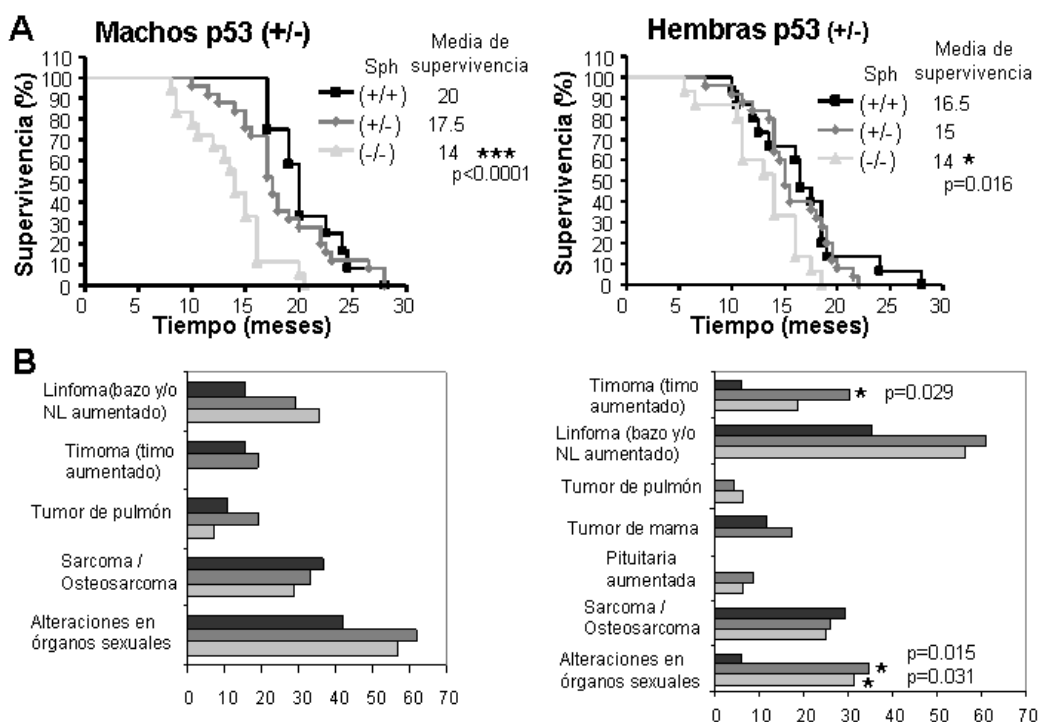
**Figura 30** La ausencia de Sph coopera con la activación de Akt en un fenotipo mamario más proliferante y en el aumento del porcentaje de lesiones benignas. **(A)** Cuantificación del fenotipo mamario en diferentes cohortes de hembras con el transgén *myrAkt* y heterocigotas (+/-) u homocigotas (-/-) para *sph*. Se estableció una clasificación de 4 categorías, de menos a más proliferante, en función de la apariencia que presentase la tinción de rojo carmín de la mama (Figura 27A). Cada mama de cada hembra nulípara y múltiparas fue clasificada en una de estas categorías. La determinación de la significación estadística se realizó mediante un test T de Student. **(B)** Análisis cuantitativo de la presencia de lesiones benignas en la glándula mamaria de hembras nulíparas y múltiparas con el transgén *myrAkt* y heterocigotas (+/-) y homocigotas (-/-) para *sph*. Se determinó el porcentaje de mamas de cada genotipo que presentaban lesiones benignas como la dilatación cística y el crecimiento alveolar (Figura 27B). Se representó dicho porcentaje y se determinó la significación estadística mediante un test T de Student. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*).

## 2.4. La ausencia de Sph coopera con la pérdida de p53.

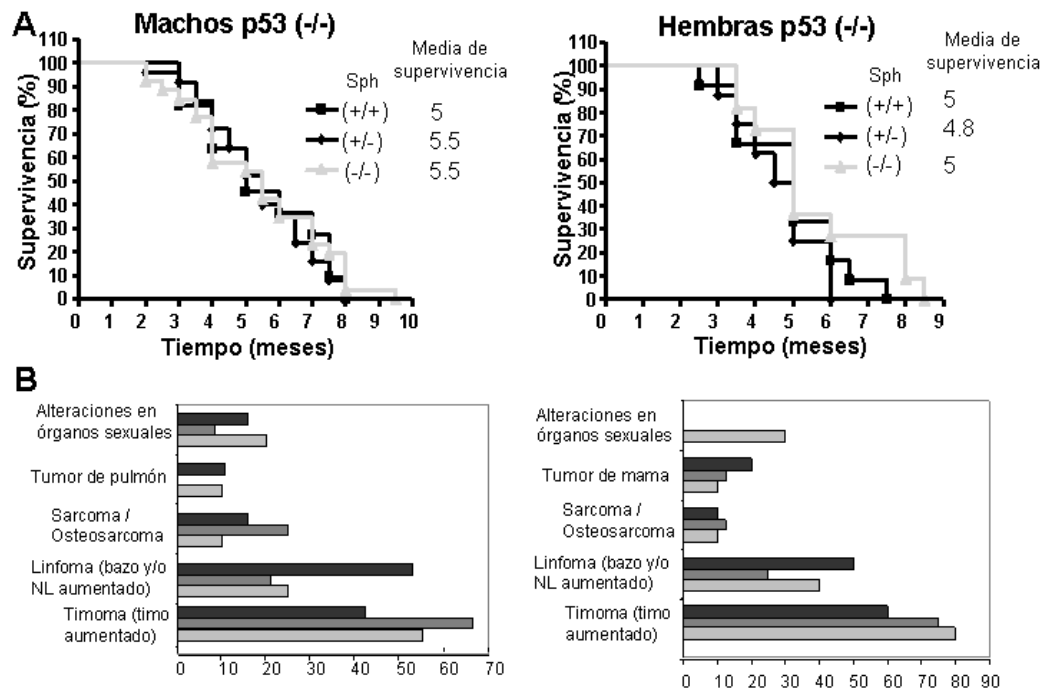
Dada la relación existente entre Sph y p53 descrita en el apartado 1.4, quisimos comprobar si existía cooperación entre la ausencia de ambos genes en la formación de tumores *in vivo*. Para ello decidimos cruzar la línea de ratones Sph KO con la línea de ratones p53 KO. Los ratones p53 KO muestran una gran incidencia de tumores espontáneos, especialmente linfomas, osteosarcomas y sarcomas de tejidos blandos. El uso de estos ratones en el cruce con otros ratones KO, resulta un modelo excelente para estudiar el mecanismo a través del cual diferentes vías de transducción de señales interaccionan con la vía de p53 para aumentar la tumorigénesis.

Obtuvimos doce colonias experimentales: tres colonias de machos heterocigotos para *p53* (*p53* (+/-)) y todos los genotipos posibles para *sph* (wt, Sph (+/+), heterocigotos,

Sph (+/-) y homocigotos, Sph (-/-) y las mismas tres colonias con hembras. Y tres colonias de machos homocigotos para *p53* (*p53* (-/-)) y todos los genotipos posibles para *sph* (wt, Sph (+/+), heterocigotos, Sph (+/-) y homocigotos, Sph (-/-) y las mismas tres colonias con hembras. Las colonias estaban formadas por 10-20 ratones por cada doble genotipo. Seguimos la evolución de todos los animales hasta que mostraron signos de enfermedad, en ese momento fueron sacrificados y se realizó la necropsia anotando la edad de muerte, todas las alteraciones macroscópicas observadas y recogiendo muestras de determinados tejidos (ver M&M). El análisis de la supervivencia de las colonias experimentales mostró que los ratones con fondo heterocigoto para *p53* que no expresaban Sph (Sph(-/-)*p53*(+/-)) mostraban una media de supervivencia menor que los que sólo expresaban *p53* en heterocigosis (Sph(+/-);*p53*(+/-)). En los machos se reducía en 6 meses y en las hembras en 2,5 meses y en ambos casos la diferencia era estadísticamente significativa ( $p < 0,001$  y  $p < 0.05$  respectivamente) (Figura 31A). Es decir, la ausencia de Sph coopera con la ausencia parcial de *p53*. Si embargo, no observamos cooperación en ausencia total de *p53*, todos los genotipos presentaban una media de supervivencia similar (Figura 32A), quizá debido a que los ratones que no expresan *p53* desarrollan tumores muy rápidamente, por lo que presentan una media de supervivencia muy corta (5 meses) y resulta muy difícil observar cooperación entre la ausencia de los dos genes.



**Figura 31 La ausencia de Sph reduce la media de supervivencia en ratones heterocigotos para *p53* y aumenta el número de alteraciones en los órganos sexuales en las hembras. (A) Supervivencia de ratones heterocigotos (+/-) y homocigotos (-/-) para *sph* en fondo heterocigoto para *p53* (+/-).** Curvas de supervivencia de las colonias experimentales de machos y hembras, de 20 ratones por genotipo. La significación estadística se determinó mediante un test Chi cuadrado. **(B) Causas macroscópicas de muerte.** Representación gráfica de los porcentajes de alteraciones encontradas en los ratones sacrificados. Se determinó la significación estadística mediante un test T de Student, refiriendo los porcentajes de alteración en cada órgano a los porcentajes de alteración en el mismo órgano en ratones wt. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*).



**Figura 32** La ausencia de Sph no afecta a la media de supervivencia en ratones homocigotos para *p53*. **(A)** Supervivencia de ratones heterocigotos (+/-) y homocigotos (-/-) para *sph* que no expresan *p53* (-/-). Curvas de supervivencia de las colonias experimentales de machos y hembras, de 20 ratones por genotipo. La significación estadística se determinó mediante un test Chi cuadrado **(B)** Causas macroscópicas de muerte. Representación gráfica de los porcentajes de alteraciones encontradas en los ratones sacrificados. Se determinó la significación estadística mediante un test T de Student, refiriendo los porcentajes de alteración en cada órgano a los porcentajes de alteración en el mismo órgano en ratones wt. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*)

El análisis de las alteraciones macroscópicas encontradas en las necropsias mostró que las únicas diferencias significativas entre genotipos en los ratones con fondo *p53* (+/-), eran las alteraciones en los órganos sexuales en las hembras *Sph*(+/-);*p53*(+/-) y *Sph*(-/-);*p53*(+/-) (Figura 31B). Estos tejidos expresan *Sph* en individuos wt por lo que su alteración podría explicarse en ratones que no expresan *Sph*. Además, observamos un ligero aumento en alteraciones en otros órganos. Es muy probable que la ausencia de *Sph* produzca alteraciones tumorales en múltiples órganos en diferentes animales, cuya suma produzca la disminución de la supervivencia observada. De cualquier manera, sería necesario un estudio histopatológico más completo de los distintos órganos para obtener datos más precisos sobre la causa de la muerte y así poder concluir el motivo por el cual la ausencia de *Sph* reduce la media de supervivencia en ratones con fondo heterocigoto para *p53* (*p53*(+/-)).

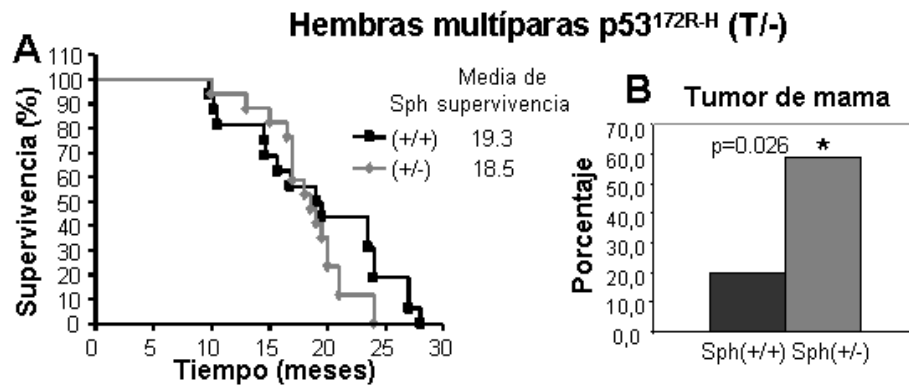


## 2.5. La ausencia de Sph coopera con la mutación de p53.

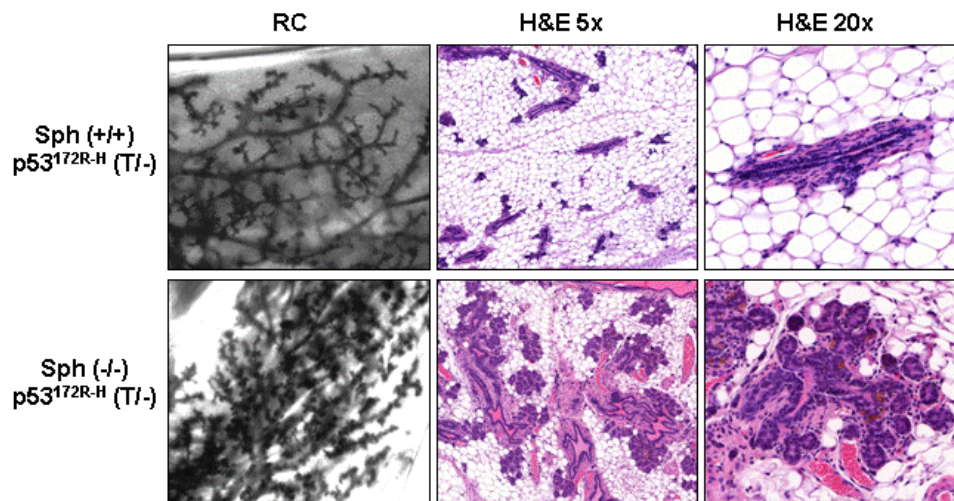
Los ratones con ausencia total de p53 (p53 (-/-)) desarrollaban tumores tan rápidamente que dificultaban el estudio de la cooperación con la ausencia de Sph. Además, observamos que la ausencia de Sph favorecía la proliferación en la glándula mamaria (ver apartado 2.2). Por estos motivos decidimos usar una línea transgénica que expresaba la forma mutada de p53<sup>172R-H</sup> (análoga a la mutación humana p53<sup>175R-H</sup>, la segunda mutación de p53 más frecuente en tumores mamarios humanos) bajo el promotor WAP, el cual dirige la expresión de este transgén a la glándula mamaria (84). Esta línea transgénica no muestra alteraciones en el desarrollo normal de la glándula mamaria, presenta una mayor susceptibilidad a la formación de tumores de mama inducidos por el carcinógeno DMBA y aunque presenta una baja incidencia de tumores mamarios espontáneos (10-20%), resulta un excelente modelo para estudiar el mecanismo a través del cual el mutante p53<sup>172R-H</sup> puede cooperar con otros genes supresores de tumores involucrados en la carcinogénesis mamaria (84).

Obtuvimos cohortes (n=15-20) de ratones hembras multíparas de los genotipos dobles Sph(+/-);p53<sup>172R-H</sup>(T/-), Sph(+/-);p53<sup>172R-H</sup>(T/-), Sph(-/-);p53<sup>172R-H</sup>(T/-). Seguimos la evolución de todos los animales hasta que mostraron signos de enfermedad, en ese momento fueron sacrificados y se procedió a su estudio. En el análisis de las colonias observamos que las cohortes que expresaban p53<sup>172R-H</sup> en un fondo heterocigoto para *sph* (Sph(+/-);p53<sup>172R-H</sup>(T/-)) mostraban una media de supervivencia similar a las que presentaban *sph* wt (Sph(+/-);p53<sup>172R-H</sup>(T/-)) (Figura 33A), pero un mayor porcentaje de hembras presentaban tumores de mama (60% vs 20%) (p<0.05) (Figura 33B). Aunque también se generó una cohorte de hembras multíparas Sph(-/-);p53<sup>172R-H</sup>(T/-), no se muestran datos de supervivencia ni de porcentajes de tumores de mama ya que actualmente no contamos con un número suficiente de ratones para analizar. Sin embargo analizamos la proliferación del tejido mamario mediante tinciones de rojo carmín y hematoxilina y eosina de ratones Sph(+/-);p53<sup>172R-H</sup>(T/-) y Sph(-/-);p53<sup>172R-H</sup>(T/-) y observamos que la ausencia de Sph favorecía la proliferación del epitelio mamario (Figura 34).

Nuestros datos confirman la cooperación entre la pérdida o reducción de Sph y las mutaciones en p53 en la inducción del fenotipo tumoral.



**Figura 33 La ausencia parcial de Sph favorece la formación de tumores de mama en presencia del transgén  $p53^{172R-H}$ . (A) Supervivencia de ratones heterocigotos (+/-) para *sph* que expresan el transgén  $p53^{172R-H}$ .** Curvas de supervivencia de las colonias experimentales de hembras multíparas, de 15-20 ratones por genotipo. La significación estadística se determinó mediante un test Chi cuadrado. **(B) Porcentajes de tumores de mama observados macroscópicamente.** Representación gráfica de los porcentajes de tumores de mama encontrados en los ratones sacrificados. Se determinó la significación estadística mediante un test T de Student, refiriendo a los porcentajes de alteración en ratones wt. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*).



**Figura 34 La ausencia de Sph favorece un fenotipo mamario más proliferante en ratones que expresan el transgén  $p53^{172R-H}$ .** Tinciones de Rojo Carmín (RC) y hematoxilina y eosina (H&E) del epitelio mamario de hembras multíparas Sph(+/-); $p53^{172R-H}$ (T/-) y Sph(-/-); $p53^{172R-H}$ (T/-). Se muestran fotos representativas del epitelio mamario de hembras multíparas Sph(+/-); $p53^{172R-H}$ (T/-) y Sph(-/-); $p53^{172R-H}$ (T/-), se muestran tinciones de RC y de H&E a dos aumentos diferentes (5x y 20x)

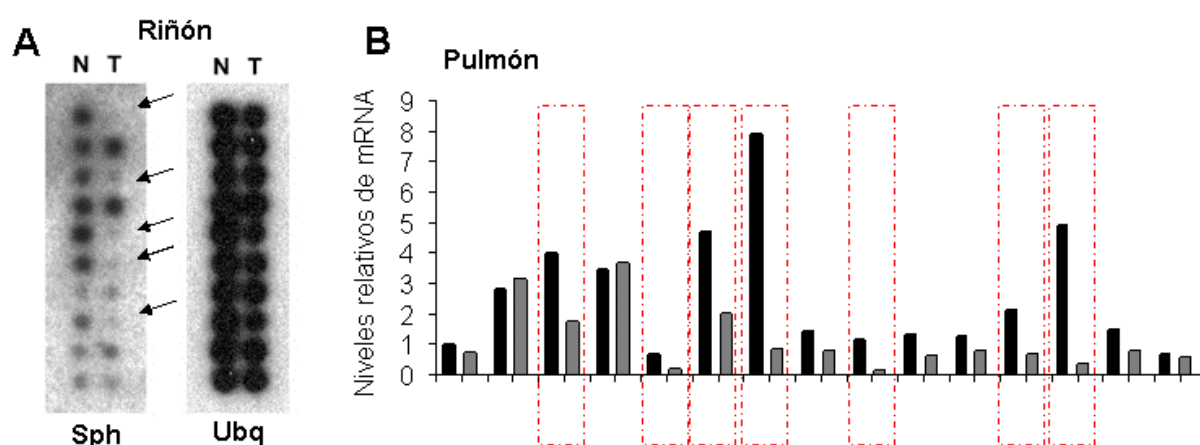


### 3. Sph como supresor tumoral en tumores humanos.

Nuestros datos sugerían que la ausencia de Sph podría favorecer el crecimiento de algunos tumores ya que aumentaba algunas propiedades tumorales de las células. Por este motivo, quisimos estudiar si la ausencia de Sph podría ser un marcador de tumorigenicidad.

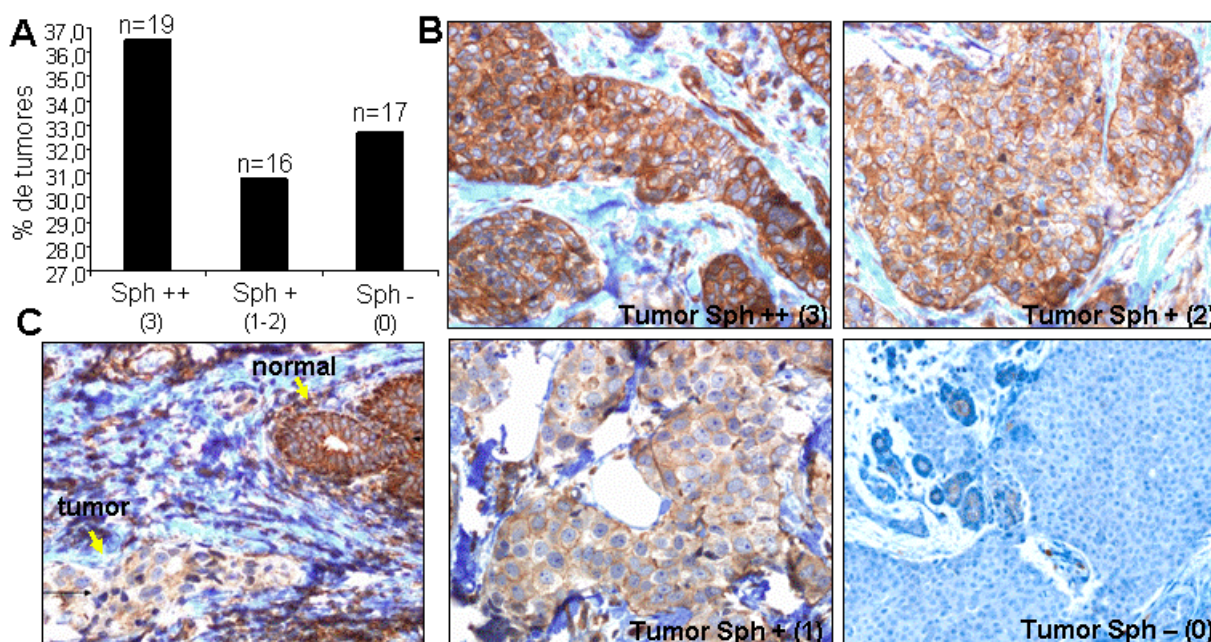
#### 3.1. La expresión de Sph se pierde en algunos tumores humanos.

Para estudiar la relación de pérdida de Sph en tumores humanos realizamos tres tipos de estudios: expresión de ARN en matrices de diferentes pacientes con diferentes tumores, RT-PCR de diferentes pacientes con tumores de pulmón e inmunohistoquímica de diferentes tumores mamarios. En el primer estudio, utilizamos matrices de muestras de ARNm de tejido normal y tumoral del mismo paciente. Sobre ellas hibridamos una sonda de ADNc de *Sph* marcada radiativamente y como control hibridamos la misma matriz con una sonda de *Ubiquitina*. Observamos que en algunos tumores, como los carcinomas renales, se perdía la expresión de *Sph* al compararlo con el tejido normal del mismo paciente en el 50% de los casos (Figura 35A). En el segundo estudio, se realizó un análisis cuantitativo de los niveles del ARNm de *Sph* en tumores de pulmón. Se seleccionaron 15 pacientes con tumores de pulmón, de los cuales se extrajo ARN total tanto de tejido normal como de tejido tumoral. Posteriormente, se cuantificó en cada muestra el ARNm de *Sph* mediante Q-RT/PCR. Observamos que 7 de los 15 casos (el 47%) mostraban una disminución de más del 50% en la expresión de *Sph* con respecto al tejido normal (Figura 35B).



**Figura 35 El ARNm de *Sph* se encuentra disminuido en muestras tumorales de riñón y pulmón. (A) Estudio de los niveles de ARNm de *Sph* en matrices de ARN de tumores.** Matrices de muestras pareadas no tumoral/tumoral (N/T) del mismo paciente fueron hibridadas con una sonda de *Sph* marcada con  $P^{32}$  para determinar la cantidad relativa de ARNm de *Sph*. Se muestra la hibridación para el tejido de riñón y su correspondiente control de ubiquitina (Ubq). **(B) Análisis cuantitativo de los niveles de ARNm de *Sph* en pacientes con tumor de pulmón.** Se cuantificaron los niveles de ARNm de *Sph* en muestras no tumorales (negro) y tumorales (gris) de 15 pacientes con tumor de pulmón. La cuantificación se hizo por Q-RT-PCR como se describe en M&M. En rojo se recuadran los 7 casos en los que en el tejido tumoral los niveles de *Sph* mostraron una reducción de más del 50%.

Por último, el tercer estudio fue dirigido a corroborar estos datos procedentes de estudios a nivel de ARNm con la expresión de Sph a nivel proteico. Para ello se analizaron muestras procedentes de tumores de mama por inmunohistoquímica. Todas las muestras fueron analizadas en la misma preparación en micromatrices de tejido (TMA). Se analizaron 52 casos de tumores de mama, asignando a cada tinción para Sph un valor de 0 (tinción negativa) a 3 (altos niveles comparables a tejido normal). En la figura 36B se muestran tumores de los 4 niveles de tinción para Sph. La figura 36C muestra una misma muestra con tejido normal y tumoral. Todas las muestras fueron valoradas dos veces independientes a doble ciego y se obtuvo la media de ambas observaciones. El análisis de los tumores mostró que el 33% (17 de 52) no presentaban tinción para Sph, mientras que otro 31% de casos (16 de 52) mostraban niveles reducidos de Sph pero no pérdida completa (Figura 36A).

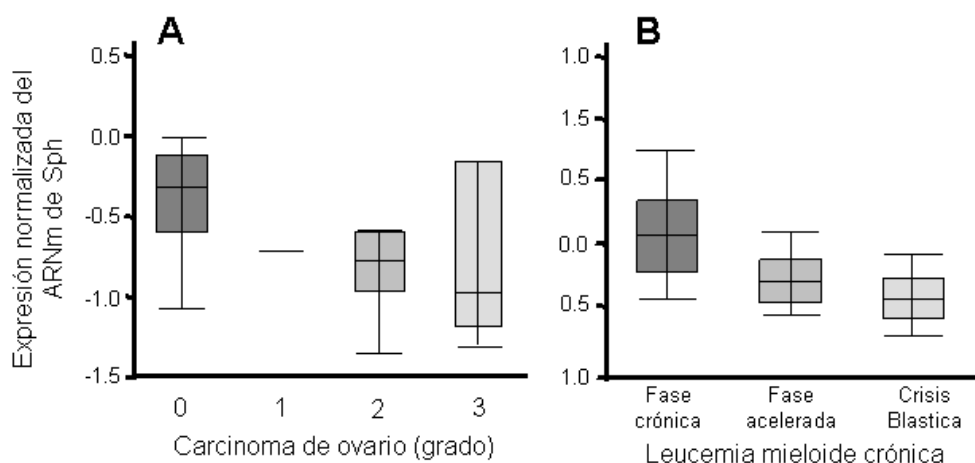


**Figura 36 El 33% de los tumores de mama pierden la expresión de Sph. (A) Análisis cuantitativo de la pérdida de expresión de la proteína Sph en tumores de mama.** Representación del porcentaje de tumores de mama positivos y negativos para la expresión de Sph mediante IHQ. Todas las muestras fueron analizadas en la misma preparación en micromatrices de tejido (TMA). Sph ++ (3): altos niveles de expresión de Sph comparables a tejido control no tumoral; Sph + (1-2): niveles intermedios de Sph significativamente más bajos que el control pero no negativos para Sph; Sph - (0): tinción negativa para Sph. **(B) Caracterización inmunohistoquímica de tumores de mama.** Imágenes de la IHQ para Sph de 4 tumores de mama representativos de los 4 niveles de tinción para Sph. **(C) Caracterización inmunohistoquímica de un tumor de mama.** Imagen de un tumor de mama que perdió la expresión de Sph pero que la mantenía en el epitelio mamario no tumoral.

Todos estos datos confirmaban la pérdida de expresión de Sph en diferentes tipos de tumores lo que apoyaba la teoría de que Sph se comportara como un supresor de tumores.

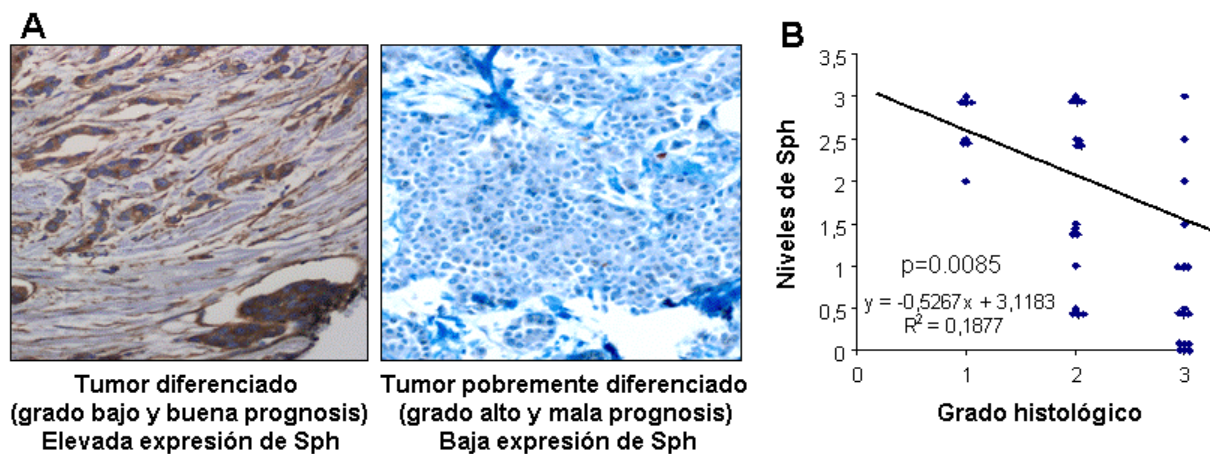
### 3.2. La ausencia de Sph se correlaciona con el estadio del tumor.

Hicimos un análisis de los datos correspondientes a diferentes estudios incorporados en la base de datos Oncomine (111). Analizamos diferentes estudios de la expresión de los niveles de ARNm de *Sph*, estudios en carcinoma de ovario (Figura 37A) y en leucemia mieloide crónica (Figura 37B) en diferentes estadios. Se observó que se producía una reducción en los niveles de ARNm de *Sph* en tejido tumoral y que dicha reducción era mayor conforme aumenta el grado de malignidad del tumor.



**Figura 37 La reducción del ARNm de *Sph* se correlaciona con el grado de malignidad del tumor. Análisis de datos correspondientes a diferentes estudios recopilados en la base de datos Oncomine.** Se muestran los niveles normalizados de ARNm de *Sph* en carcinoma de ovario (54) (A) y en leucemia mieloide crónica (109) (B) en diferentes estadios. Las gráficas fueron directamente extraídas de la información que ofrece la base de datos Oncomine (111)

A continuación analizamos la correlación entre los niveles de proteína Sph y el grado del tumor en muestras mamarias. Para ello realizamos un estudio inmunohistoquímico de muestras procedentes de tumores de mama de diferente grado de malignidad. Se tiñeron en la misma preparación (TMA) 52 muestras distintas y se valoraron visualmente dos veces (doble ciego) los niveles de Sph comparados a tejido normal. Se asignó el valor 0 a la no expresión y el 3 a la expresión alta. Se obtuvo la media entre ambas observaciones y se correlacionó con el grado de malignidad (Figura 38). Se observó que los niveles más bajos de Sph se correlacionaban de forma estadísticamente significativa con tumores de grado histológico mayor y con peor prognosis.

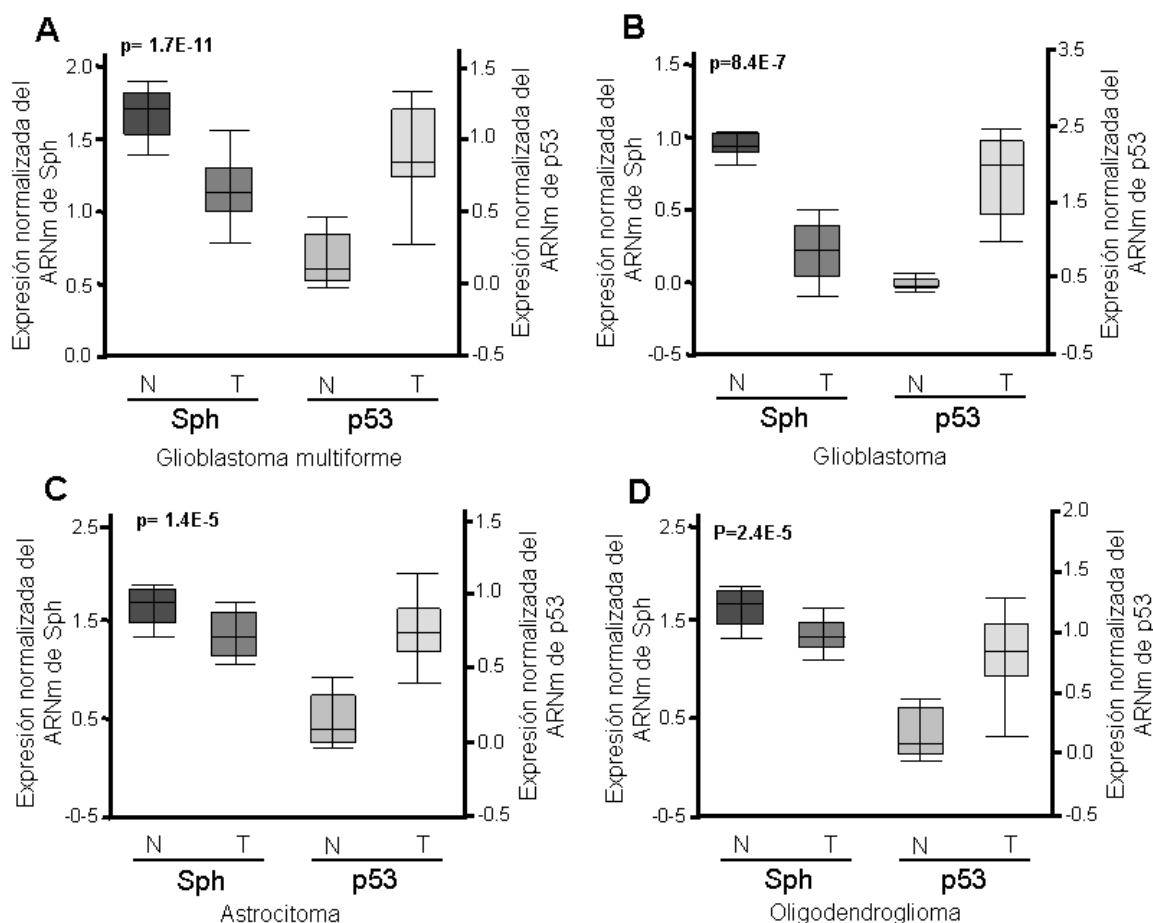


**Figura 38** La pérdida de expresión de Sph se correlaciona con tumores de mama de estadio más avanzado. **(A)** Caracterización inmunohistoquímica. Ejemplos de tumores de mama en diferente estadio y con diferentes niveles de Sph. IHQ para Sph en dos tumores de mama representativos (de 52 tumores analizados), uno de bajo grado (panel izquierdo) y otro de alto grado (panel derecho). **(B)** Análisis cuantitativo de la relación entre la pérdida de Sph y el estadio del tumor mamario. Representación gráfica de la correlación de la pérdida de expresión de Sph con el grado histológico avanzado. Se asignó 0 a la no expresión y 3 a la expresión alta. Se obtuvo la media de dos valoraciones ciegas y se correlacionó con el grado del tumor. Se representa una curva de regresión, el coeficiente de correlación múltiple ( $y$ ), la media del porcentaje de variabilidad de la recta ( $R^2$ ) y la significación estadística ( $p=0.0085$ ).

Estos datos sugerían la posible aplicación de la determinación de la ausencia de Sph como factor de mala prognosis.

### 3.3. La pérdida de expresión de Sph en tumores se correlaciona con la mutación en p53.

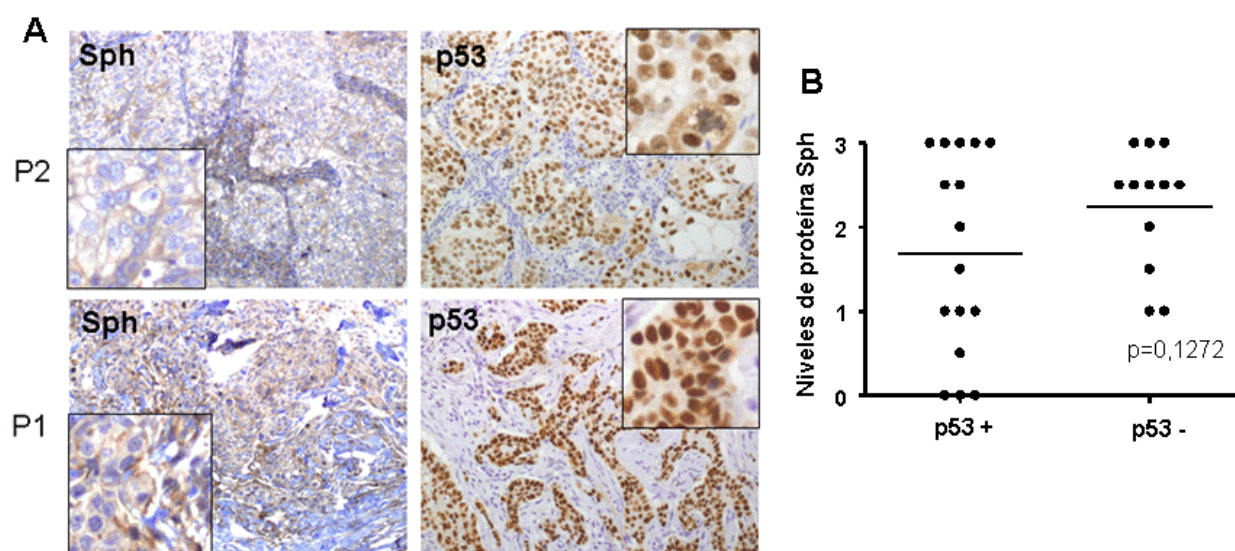
En primer lugar realizamos un análisis de la información transcripcional depositada en la base de datos Oncomine (111). Analizamos diferentes estudios de distintos tumores cerebrales en los que se valoraron los niveles de expresión del ARNm de *Sph* y *p53* comparándolos con los niveles de expresión en tejido normal. Observamos que todos estos tumores cerebrales: glioblastoma multifome (Figura 39A), glioblastoma (Figura 39B), astrocitoma (Figura 39C) y oligodendroglioma (Figura 39D) mostraban una reducción significativa en los niveles del ARNm de *Sph* con respecto al tejido normal. Además, todos estos casos mostraban un aumento significativo en los niveles del ARNm de *p53*. Estos datos mostraban una correlación significativa entre la reducción de la expresión de *Sph* y el aumento de la expresión de *p53*, lo que se correlacionaba con nuestros resultados obtenidos en células en cultivo, aunque en este caso se medía ARN.



**Figura 39 La reducción en los niveles del ARNm de *Sph* en tumores cerebrales se correlaciona con el aumento de los niveles del ARNm de *p53*. Análisis de datos correspondientes a diferentes estudios recopilados en la base de datos Oncomine.** Se muestran los datos de los niveles normalizados de ARNm de *Sph* y *p53* en diferentes tumores cerebrales: **(A)** Glioblastoma multiforme. **(B)** Glioblastoma. **(C)** Astrocitoma. **(D)** Oligodendroglioma. Las gráficas fueron directamente extraídas de la información que ofrece la base de datos Oncomine (111). Se muestra el ARNm de tejido normal (N) y de tejido tumoral (T). En todos los casos la correlación es estadísticamente significativa.

Si esta relación funcional existía, era posible que el aumento transcripcional de *p53* terminase en una mutación en el tumor para desbloquear su crecimiento. Por eso, decidimos estudiar la correlación entre la ausencia de *Sph* y la mutación de *p53* en un estudio inmunohistoquímico de la expresión de ambas proteínas en una serie de 30 tumores de mama. Se procedió a la valoración visual de los niveles de *Sph* como se indica en los apartados 3.1 y 3.2 y a la valoración visual de la expresión de *p53* (positiva o negativa) en la misma muestra tumoral. El estudio mostró una tendencia de pérdida de *Sph* en tumores en los que la tinción para *p53* era muy positiva, es decir, tumores en los que *p53* estaba mutado (Figura 40B).





**Figura 40 La pérdida de expresión de Sph se correlaciona con la mutación de *p53* en tumores de mama. (A) Caracterización inmunohistoquímica. Ejemplos de tumores de mama de dos pacientes.** Se muestra la doble tinción IHQ para Sph y p53 del tumor mamario de dos pacientes (P1 y P2) que expresan muy bajos niveles de Sph y tinción positiva de p53. **(B) Análisis cuantitativo de la correlación entre la mutación de *p53* y la disminución de la expresión de Sph.** Representación gráfica de la correlación de la pérdida de expresión de Sph con la tinción positiva de p53. Se asignó 0 a la no expresión de Sph y 3 a la expresión alta de Sph. Se asignó p53- a la ausencia de tinción de p53 y p53+ a la tinción de p53 que se corresponde con la mutación de *p53*. Se obtuvo la media de dos valoraciones ciegas y se correlacionaron ambas medidas. La significación estadística se determinó mediante un test T de Student ( $p=0.1272$ ).

Aunque estos datos no eran estadísticamente significativos, probablemente porque el número de casos no era lo suficientemente grande, apoyaban a los datos extraídos del Oncomine. Sin embargo, un análisis detallado de los casos con bajos niveles de Sph (<0.5; n=4) indicó que en todos los casos *p53* se encontró mutado (Figura 40A), reafirmando nuestra hipótesis. Así, la mutación en *p53* parece ser un requisito esencial para permitir el crecimiento tumoral en ausencia de Sph.

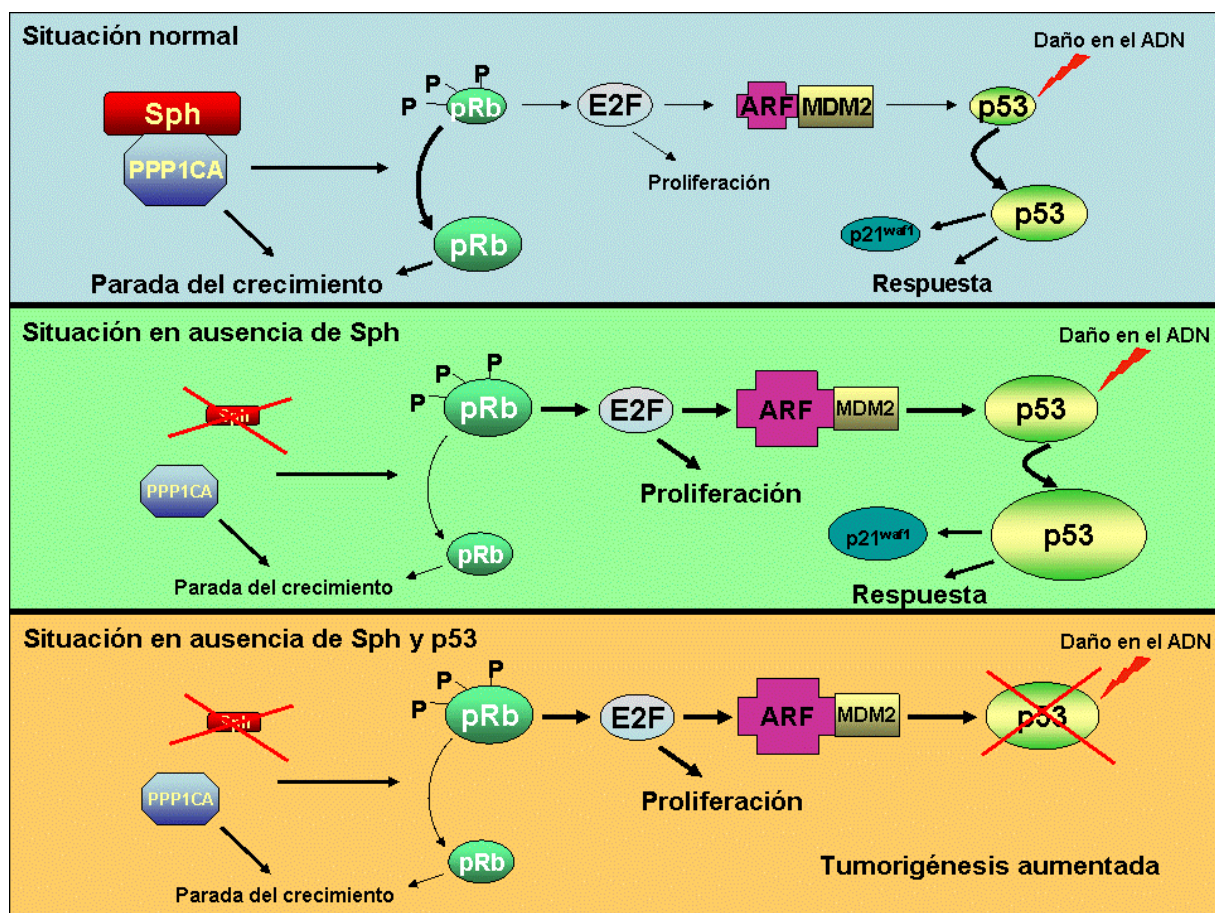
## Discusión

---





El proceso de senescencia actúa como un mecanismo supresor de tumores al limitar el potencial replicativo de las células. El conocimiento de las vías de señalización que controlan el proceso de senescencia aportaría la posibilidad de actuar en dichas vías a nivel farmacológico con objeto de bloquear el crecimiento tumoral. De ahí, nuestro interés en identificar y estudiar genes críticos en el proceso de senescencia. Mediante la realización de un rastreo genético por pérdida de función se identificó a *sph* como un gen cuya ausencia facilitaba la immortalización celular. Sph es una proteína de anclaje que se une y regula la función de muchas proteínas tales como PP1 $\alpha$  (126). Posteriormente, observamos que mientras que el antisentido frente a *sph* encontrado en el rastreo genético mostraba un efecto débil de facilitación de la immortalización, la ausencia total de Sph en MEFs KO no mostraba este efecto, probablemente porque en este caso no se producía una inhibición brusca de la función de Sph y la célula podía buscar una vía redundante para suplir la ausencia de dicha proteína. Sin embargo, encontramos que Sph podía tener otros efectos en el proceso de immortalización celular, ya que en su ausencia la immortalización celular siempre ocurría a través de la mutación de *p53*, lo que sugería que la ausencia de Sph forzaba la mutación de *p53* facilitando la immortalización. Por otro lado, encontramos que la ausencia de Sph producía una disminución en los niveles de Ppp1ca y de esta manera facilitaba la inactivación de pRb favoreciendo la proliferación celular. Además, observamos que la ausencia de Sph inducía una mayor activación de p53 aumentando su respuesta biológica y que este efecto se producía a través de Ppp1ca y p19<sup>ARF</sup>. Sin embargo, en ausencia de p53, la ausencia de Sph aumentaba ciertas propiedades tumorales de las células, lo que sugería que Sph podía comportarse como un supresor tumoral en ausencia de p53. Por otro lado, la sobreexpresión de Sph producía inhibición del crecimiento independientemente del estado de p53 y pRb, sugiriendo que p53 y pRb no eran los únicos efectores de la actividad supresora tumoral de Sph. Esto correlacionaba con los resultados obtenidos de la sobreexpresión de Ppp1ca (22), que presenta los mismos efectos que la sobreexpresión de Sph. El papel de Sph como supresor tumoral y el mecanismo a través del cual Sph ejerce dicha función se vieron reforzados por los siguientes datos: primero, la observación de que la expresión de Sph se perdía en algunas líneas celulares; segundo, el efecto de la ausencia de Sph en modelos animales reduciendo la supervivencia, aumentando la proporción de determinados tumores y lesiones benignas y cooperando con otras alteraciones con potencial tumoral como la mutación de *p53*; tercero, la observación de que la expresión de Sph se perdía en determinados tumores humanos correlacionándose con los grados más avanzados de malignidad y con la mutación de *p53*. Con todos estos datos, proponemos el siguiente modelo (Figura 41) para explicar los efectos observados en ausencia de Sph y su papel como supresor tumoral en ausencia de p53.



**Figura 41 Modelo del efecto de Sph y su posible mecanismo.** Se representa el modelo de la ruta en la que intervendría Sph en una situación normal (en azul). Se muestra el efecto que tendría en esta ruta la ausencia de Sph (en verde) y la ausencia de Sph junto con la ausencia de p53 (en naranja).

En este modelo (Figura 41) proponemos que Sph interviene en el proceso de activación de pRb, actuando como regulador de la subunidad catalítica (Ppp1ca) de la fosfatasa encargada de la defosforilación de pRb, PP1 $\alpha$  (1). pRb en su estado activo hipofosforilado suprime la actividad de E2F y por tanto la inducción de la transcripción de algunos genes como los requeridos para la progresión del ciclo celular. En ausencia de Sph los niveles de Ppp1ca disminuyen y por tanto se reduce la defosforilación de pRb aumentando su inactivación. Esto permite la activación transcripcional de las dianas de E2F aumentando por un lado la proliferación y por otro los niveles de ARF, que mediante el secuestro de Mdm2 aumenta los niveles de p53. Si en este contexto en el que partimos de niveles mayores de p53 se induce daño en el ADN, el aumento tanto de los niveles de p53 como de su actividad transcripcional es mayor, lo que se traduce en un mayor aumento de los niveles de p21<sup>waf1</sup> y una mayor respuesta biológica de p53. Sin embargo, si la ausencia de Sph va acompañada de la ausencia de p53, el aumento en la inactivación de pRb sólo se traducirá en un aumento de la proliferación derivado de la activación de los genes dianas de E2F, ya que el aumento de ARF no podrá ejercer su efecto dependiente de p53. En estas circunstancias la ausencia de Sph favorece la progresión tumoral.

Según el modelo que proponemos, la ausencia de Sph tendría dos efectos opuestos encadenados, por un lado favorecería la inactivación del supresor tumoral pRb y por otro, y como consecuencia de ello, aumentaría la activación de p53 en respuesta al daño en el ADN. Es decir, por un lado la ausencia de Sph favorecería la proliferación de las células tumorales, pero por otro lado las haría más sensibles a la respuesta de p53 inducida por el daño al ADN favoreciendo la eliminación de dichas células. De hecho, se observa más apoptosis en células Sph (-/-) al ser tratadas con 3MC, coincidente con una mayor fosforilación de pRb (Figura 12). Por el contrario, en las células que sean resistentes a la activación de la vía de p53, por presentar *p53* mutado, la pérdida de Sph favorecería su progresión hacia un fenotipo maligno, en parte debido a la inactivación de pRb. De esta manera el papel de Sph como supresor tumoral depende del contexto, es decir, Sph ejerce ese papel cuando p53 es inactivo. Además de Sph, hay otros muchos productos de genes que muestran papeles opuestos en la tumorigénesis dependiendo del contexto en el que se encuentren (116), algunos ejemplos son TGF $\beta$  (134), Notch (110), E2F (36), KLF4 (116), y p21<sup>waf1</sup> (113). Entre todos, cabe destacar el doble papel de p21<sup>waf1</sup> cuya sobreexpresión por un lado tiene efectos citostáticos (64) y por otro confiere resistencia a apoptosis (47) y de E2F cuya sobreexpresión induce parada del crecimiento y apoptosis a través de p53 (108, 156) pero además causa transformación de las células (73, 135).

Entre los modelos celulares utilizados, el que muestra más claramente este doble papel de Sph es el basado en MEFs *p53* (-/-) que expresan un alelo termosensible de *p53* y el oncogén *ras* (MEFs *p53*(-/-)ts-*ras*) (21). En este modelo introducimos shRNAs frente a *sph* y observamos como la reducción de los niveles de Sph presentaba un papel opuesto en función de la activación de p53. En presencia de p53 activo, a pesar de mantener pRb en su estado inactivo, encontramos una mayor respuesta biológica de p53 que se traducía en una mayor inhibición del crecimiento. Por el contrario, en presencia de p53 inactivo, la ausencia de Sph favorecía el crecimiento como consecuencia de potenciar la inactivación de pRb.

Otro modelo en el que observamos muy bien este papel de Sph dependiente de los niveles de p53 fue el tratamiento con 3MC de ratones que no expresaban Sph (Sph KO) en fondo normal o en fondo heterocigoto para *p53* (SphKO;*p53*(+/-)). En los ratones que no expresaban Sph, mientras que el tratamiento con un carcinógeno no dependiente de la vía p53, DMBA oral y en tintura, no mostraba diferencias (datos no mostrados), el tratamiento con 3MC producía tumores más tardíamente, lo que podría explicarse por la mayor activación de p53 en ausencia de Sph. Sin embargo, la ausencia de Sph no producía retraso en la tumorigénesis en ratones con *p53* en hemicirosis (Figura 15). Este experimento, junto con otros, sugería que los efectos no eran un “todo o nada” sino que venían determinados

por una regulación fina de la vía donde los niveles relativos de las proteínas jugaban un papel importante.

Respecto al mecanismo molecular a través del cual Sph ejerce un papel en tumorigénesis, observamos que la ausencia de Sph producía una disminución en los niveles de Ppp1ca y viceversa, una disminución en los niveles de Ppp1ca producía una disminución en los niveles de Sph. Por el contrario, el aumento en los niveles de Ppp1ca producido por Ras se correlacionaba con un aumento en los niveles de Sph. Además, se ha descrito un aumento en los niveles de PP1 $\alpha$  tras el tratamiento con drogas proapoptóticas como araC y etopósido (154) y nosotros observamos un aumento en los niveles de Sph con tratamientos similares. Estos datos reflejan una correlación entre los niveles de Sph y Ppp1ca y sugieren que ambas proteínas se estabilizan mutuamente. También observamos que la disminución de los niveles de Ppp1ca producidos por la ausencia de Sph producía un efecto similar al producido por el shRNA frente a *ppp1ca* (22), un aumento de la hiperfosforilación de pRb y por tanto de su inactivación. Además, comprobamos que estados hipofosforilados de pRb se correlacionaban con altos niveles de Sph, lo que reforzaba el hecho de que Sph interviniera en la defosforilación y por tanto en la activación de pRb y que así, la ausencia de Sph pueda interferir en este proceso. De hecho, observamos como la ausencia de Sph al favorecer la hiperfosforilación de pRb producía una serie de efectos biológicos como la recuperación temprana del crecimiento tras la estimulación con suero de células quiescentes, el aumento de la formación de colonias y de la proliferación en MEFs con p53 inactivo o el aumento de la apoptosis inducida por daño en el ADN vía p53. Este último efecto derivado de la ausencia de Sph, que consiste en el aumento de la respuesta de p53 frente al daño en el ADN, lo observamos tanto en modelos celulares como en modelos animales y vimos que ocurría a través de la disminución de Ppp1ca y de la presencia de p19<sup>ARF</sup> (Figuras 17 y 19). Sin embargo, en ausencia de p19<sup>ARF</sup> la ausencia de Sph sí ejercía el otro efecto derivado de la inactivación de pRb, la recuperación temprana del crecimiento y el aumento de la proliferación. Esto no sólo demuestra que el aumento de la respuesta de p53 inducido por la ausencia de Sph es dependiente de p19<sup>ARF</sup>, sino también, que ocurre una vez ha tenido lugar la inactivación de pRb. De esta manera definimos una relación funcional, aunque no física, de Sph y p19<sup>ARF</sup>. Previamente se había descrito una relación funcional y física entre ambas proteínas (149), nosotros en cambio no hemos sido capaces de reproducir esa relación física. Por otro lado, el efecto del aumento de la respuesta de p53 inducida por daño en el ADN nos llevó a observar que la expresión de Sph se inducía bajo tratamientos que producían este tipo de daño, esto sugiere que el gen de *sph* podría ser una diana transcripcional de p53, y puesto que la ausencia de Sph aumenta los niveles de p53, quizá

Sph podría intervenir en un circuito de retroalimentación negativo de p53, aunque serían necesarios más estudios para confirmar esta teoría.

El hecho de que en ausencia de Sph la respuesta de la vía de p53 esté aumentada hace que la inactivación de la vía favorezca la progresión en el proceso de tumorigénesis, esto explicaría porqué en el proceso de immortalización todos los clones homocigotos para *sph* presentan *p53* mutado. Sin embargo, ninguno de ellos presenta pérdida de expresión de p16<sup>INK4a</sup>, que participa en la inactivación de la vía de pRb durante la immortalización celular. Resulta interesante que ninguno de los clones con *sph* en hemicigosis pierda la expresión de p16<sup>INK4a</sup>, ni los clones que presentan *p53* mutado, ni los que han perdido la expresión de p19<sup>ARF</sup>. Esto podría deberse a que los clones con niveles reducidos de Sph presentan niveles elevados de pRb inactivo, de ahí que en estos clones no se seleccione la pérdida de expresión de p16<sup>INK4a</sup>. Esto concuerda con la exclusividad entre mutaciones en p16<sup>INK4a</sup> y pRb descrita en otros trabajos (103, 159).

Puesto que *sph* fue identificado en un rastreo genético basado en senescencia como un gen cuya ausencia favorecía la immortalización celular, nos preguntamos cómo la ausencia de Sph podía llegar a favorecer dicho proceso. Nuestros datos sugerían que lo podía hacer a diferentes niveles: a nivel de p53, al aumentar la respuesta de p53 hace que se ejerza una presión hacia la selección de mutaciones que afecten a esta vía, y a nivel de pRb, al facilitar su inactivación, los clones seleccionados por haber mutado *p53* además presentarán una mejor capacidad proliferativa, llevando a una selección de estos clones. Además, el hecho de que uno de los clones immortalizados provenientes de MEFs wt perdiera la expresión de Sph (Figura 24) validaba la identificación de Sph en el rastreo genético y reforzaba nuestra hipótesis. En concordancia, también observamos que algunas líneas celulares humanas perdían la expresión de Sph a nivel de proteína y/o ARNm. El hecho de que una de las líneas ensayadas mostrase ausencia total de la proteína pero no del ARNm sugiere que pueden existir diferentes mecanismos para inactivar a Sph, un campo que merecería una atención especial.

Por otro lado, mediante el uso de líneas celulares tumorales humanas, comprobamos también que Sph podía ejercer su función como supresor tumoral independientemente del estado de p53, pRb, p16<sup>INK4a</sup> y p14<sup>ARF</sup>. Observamos que la sobreexpresión de Sph en células con pRb producía una reducción en el número de colonias formadas, efecto que también ocurre mediante la sobreexpresión de Ppp1ca (22). Sin embargo, la sobreexpresión de Sph también producía una reducción en el número de colonias formadas en células que no expresaban pRb ni p53. Este efecto de reducción de la eficacia de formación de colonias



independiente de pRb y p53 ya había sido observado anteriormente (149). Se ha descrito que la sobreexpresión de un mutante de Ppp1ca constitutivamente activo produce parada del crecimiento de forma dependiente de pRb pero además incrementa la muerte celular de forma independiente de pRb (8). Este efecto podría deberse a que PP1 $\alpha$  defosforila y activa a Bad (2) y a caspasa-9 (37) induciendo apoptosis. Esto estaría en concordancia con nuestra hipótesis de que el efecto de Sph está mediado por Ppp1ca.

Nuestros resultados sugerían que Sph podía comportarse como un supresor tumoral en un determinado contexto lo que nos llevó a analizar dicho efecto en diferentes modelos animales. El análisis de colonias de ratones con niveles limitados de Sph mostró una reducción en la media de supervivencia y un aumento en la preponderancia de linfomas y timomas. La causa por la cual la ausencia de Sph aumenta la preponderancia de estos tumores y lo hace de forma sexo específica habría que analizarla en profundidad. Podría estar involucrada la relación de Sph con los niveles de estrógenos, ya que se ha descrito que el estradiol afecta de diferente manera a la expresión de la proteína Sph en machos y en hembras, lo que se traduce en un efecto diferente en cada uno de ellos (82). Mientras que en hembras el tratamiento con estradiol produce un aumento de las espinas dendríticas, en los machos produce una disminución de las mismas (82). En estos ratones defectivos para Sph también se observó un aumento en la proliferación del epitelio mamario y en la incidencia de lesiones benignas, sin embargo esto no desembocó en un aumento en la incidencia de tumores de mama. Este fenotipo apoyaría nuestra teoría de que la ausencia de Sph aumentaría la capacidad proliferativa de las células pero también la activación de p53 impidiendo la progresión de las lesiones benignas a estados tumorales, sin embargo, en los casos en los que se mutase *p53*, la lesión podría progresar a una lesión maligna. En otro modelo animal en el que se expresaba el transgén *myrAkt* bajo el promotor MMTV en ausencia de Sph (SphKO;*myrAkt*(T/-)), observamos que la ausencia de Sph cooperaba con la activación constitutiva de Akt reduciendo la media de supervivencia y aumentando el porcentaje de alteraciones en los órganos sexuales en los machos. Además, observamos un aumento en la proliferación del epitelio mamario y en la incidencia de lesiones benignas, aunque esto no se traducía en un aumento en la incidencia de tumores de mama, a pesar de ser uno de los tejidos en los que se expresa el transgén *myrAkt* (11). Probablemente el fondo genético de esta línea doble haya influido en este fenotipo, ya que se sabe que el fondo BL/6 es un fondo resistente a tumores de mama.

Estudiamos otros dos modelos animales que mostraron que Sph actuaba como un supresor tumoral en ausencia de p53, estos modelos se generaron mediante el cruce de la línea Sph KO y las líneas p53 KO y p53<sup>172R-H</sup> transgénica (84). En la línea doble

SphKO;p53KO observamos que la ausencia de Sph cooperaba con la pérdida heterocigota de *p53* reduciendo la media de supervivencia, sin embargo, macroscópicamente no había ningún tumor preponderante que explicara dicha reducción, probablemente los ratones murieran por el mismo tipo de tumores espontáneos, sólo que éstos pudieron aparecer antes o evolucionar más rápidamente causando la reducción en la supervivencia. De cualquier manera, sería necesario un estudio histopatológico más exhaustivo para determinar la causa de la cooperación. En la línea doble SphKO;p53<sup>172R-H</sup> transgénico observamos que la pérdida heterocigota de *sph* cooperaba con el transgén *p53*<sup>172R-H</sup> aumentando el porcentaje de tumores de mama. En este modelo, el transgén *p53*<sup>172R-H</sup> sólo se expresa en el epitelio mamario por lo que resulta lógico observar cooperación sólo en ese tejido. Además, los tumores de mama no son tumores de rápida aparición, lo que explicaría porqué la media de supervivencia no se ve reducida. Todavía no hemos podido analizar la cooperación de la pérdida homocigota de *sph* con el transgén *p53*<sup>172R-H</sup>, pero en vista de los resultados obtenidos con el heterocigoto de *sph* y del análisis histológico del epitelio mamario de estos ratones que muestra un fenotipo más proliferativo, cabría esperar una cooperación mayor.

En vista de los datos obtenidos en los modelos animales, quisimos comprobar la relevancia de la pérdida de Sph en tumores humanos. La expresión de *Sph* se vio disminuida en tejidos tumorales de riñón y pulmón cuando se comparó con muestras no tumorales del mismo tejido del mismo paciente. Además, se observó que el 32% de un panel de 52 tumores de mama habían perdido la expresión de la proteína Sph. Nosotros nos centramos en el estudio de un panel de tumores de mama debido a la observación, en modelos animales, de que la ausencia de Sph favorecía la proliferación de este tejido. Nuestros datos sugieren que la pérdida de Sph confiere a la célula tumoral alguna ventaja para su progresión e indican que Sph puede tener un papel importante en la supresión tumoral. Además, observamos que la pérdida de expresión de Sph se correlacionaba con estadios más avanzados de distintos tipos de tumores, como carcinoma de mama, de ovario y leucemia mieloide crónica. Esto sugiere la posibilidad de su utilización como marcador de malignidad, aunque deberían realizarse más estudios para establecer adecuadamente su utilidad diagnóstica. Y por último, el hecho de haber observado en tumores humanos una correlación entre la pérdida de Sph y la mutación de *p53* refuerza nuestro modelo mecanístico que apoya la teoría del papel de Sph como supresor tumoral en ausencia de *p53*. El hecho de que tumores cerebrales en los que se ha perdido la expresión de *Sph* muestren niveles mayores de *p53* concuerda con nuestra hipótesis de que en ausencia de Sph, y a través de ARF, se inducen los niveles de *p53*. Y el hecho de que en ausencia de Sph los tumores de mama tiendan a mutar *p53* refuerza nuestra teoría por la cual, en los

tumores que tienen más activa la vía de p53, se selecciona dicha mutación ya que favorece la progresión tumoral.

En resumen, hemos identificado a *sph* en un rastreo genético por pérdida de función diseñado para encontrar posibles genes supresores tumorales. Hemos observado que Sph se comporta como un supresor tumoral dependiente de contexto. La ausencia de Sph favorece la inactivación de pRb a través de la disminución de Ppp1ca favoreciendo la proliferación, y al mismo tiempo, esta inactivación de pRb lleva, a través de ARF, a un aumento de la activación de p53 en respuesta al daño en el ADN. Esta doble actuación opuesta en las dos vías más importantes en la supresión tumoral, lleva a que la ausencia de Sph tenga un efecto dependiente de la presencia de p53 y favorezca la tumorigénesis en ausencia de activación de p53 tanto en modelos celulares, como en modelos animales, como en tumores humanos.



## **Conclusiones**

---



1. La ausencia de Sph se traduce en una disminución de los niveles de Ppp1ca y viceversa, sugiriendo una mutua estabilización.
2. La ausencia de Sph facilita la inactivación/fosforilación de pRb a través de la disminución de Ppp1ca.
3. La ausencia de Sph induce, a través de Ppp1ca y ARF, una mayor activación de p53 y aumenta su respuesta biológica.
4. La ausencia de Sph, en ausencia de p53, aumenta algunas propiedades tumorigénicas de las células. Por el contrario, la sobreexpresión de Sph suprime el crecimiento con independencia del estado de p53, pRb, p16<sup>INK4a</sup> y ARF.
5. La expresión de Sph se pierde en algunas líneas celulares.
6. La ausencia de Sph en ratones reduce la media de supervivencia, aumenta la preponderancia de determinados tumores y favorece la aparición de lesiones benignas en el epitelio mamario.
7. La ausencia de Sph en ratones coopera con la activación de Akt y con la pérdida de p53 reduciendo la supervivencia y con la mutación de p53 aumentando la proporción de tumores de mama.
8. La expresión de Sph se pierde en un porcentaje significativo de tumores humanos, pérdida que se correlaciona con el grado de malignidad del tumor y con la presencia de p53 mutado.



## **Bibliografía**

---



1. **Allen, P. B., C. C. Ouimet, and P. Greengard.** 1997. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9956-61.
2. **Ayllon, V., A. C. Martinez, A. Garcia, X. Cayla, and A. Rebollo.** 2000. Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *Embo J* **19**:2237-46.
3. **Barbacid, M.** 1987. ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**:779-827.
4. **Barker, H. M., T. A. Jones, E. F. da Cruz e Silva, N. K. Spurr, D. Sheer, and P. T. Cohen.** 1990. Localization of the gene encoding a type I protein phosphatase catalytic subunit to human chromosome band 11q13. *Genomics* **7**:159-66.
5. **Barnes, A. P., F. D. Smith, 3rd, H. M. VanDongen, A. M. VanDongen, and S. L. Milgram.** 2004. The identification of a second actin-binding region in spinophilin/neurabin II. *Brain Res Mol Brain Res* **124**:105-13.
6. **Bartholdi, M. F.** 1991. Nuclear distribution of centromeres during the cell cycle of human diploid fibroblasts. *J Cell Sci* **99 ( Pt 2)**:255-63.
7. **Bates, S., A. C. Phillips, P. A. Clark, F. Stott, G. Peters, R. L. Ludwig, and K. H. Vousden.** 1998. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**:124-5.
8. **Berndt, N., M. Dohadwala, and C. W. Liu.** 1997. Constitutively active protein phosphatase 1alpha causes Rb-dependent G1 arrest in human cancer cells. *Curr Biol* **7**:375-86.
9. **Bielas, S. L., F. F. Serneo, M. Chechlaczy, T. J. Deerinck, G. A. Perkins, P. B. Allen, M. H. Ellisman, and J. G. Gleeson.** 2007. Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell* **129**:579-91.
10. **Blais, A., and B. D. Dynlacht.** 2007. E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **19**:658-62.
11. **Blanco-Aparicio, C., L. Perez-Gallego, B. Pequeno, J. F. Leal, O. Renner, and A. Carnero.** 2007. Mice expressing myrAKT1 in the mammary gland develop carcinogen-induced ER-positive mammary tumors that mimic human breast cancer. *Carcinogenesis* **28**:584-94.

12. **Blander, G., R. M. de Oliveira, C. M. Conboy, M. Haigis, and L. Guarente.** 2003. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem* **278**:38966-9.
13. **Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, and W. E. Wright.** 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**:349-52.
14. **Bos, J. L.** 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**:4682-9.
15. **Brady, A. E., Q. Wang, P. B. Allen, M. Rizzo, P. Greengard, and L. E. Limbird.** 2005. Alpha 2-adrenergic agonist enrichment of spinophilin at the cell surface involves beta gamma subunits of Gi proteins and is preferentially induced by the alpha 2A-subtype. *Mol Pharmacol* **67**:1690-6.
16. **Braig, M., S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A. H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dorken, T. Jenuwein, and C. A. Schmitt.** 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**:660-5.
17. **Buchsbaum, R. J., B. A. Connolly, and L. A. Feig.** 2003. Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin. *J Biol Chem* **278**:18833-41.
18. **Campisi, J., and F. d'Adda di Fagagna.** 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:729-40.
19. **Canman, C. E., A. C. Wolff, C. Y. Chen, A. J. Fornace, Jr., and M. B. Kastan.** 1994. The p53-dependent G1 cell cycle checkpoint pathway and ataxia-telangiectasia. *Cancer Res* **54**:5054-8.
20. **Carnero, A., J. D. Hudson, G. J. Hannon, and D. H. Beach.** 2000. Loss-of-function genetics in mammalian cells: the p53 tumor suppressor model. *Nucleic Acids Res* **28**:2234-41.
21. **Castro, M. E., M. del Valle Guijarro, V. Moneo, and A. Carnero.** 2004. Cellular senescence induced by p53-ras cooperation is independent of p21waf1 in murine embryo fibroblasts. *J Cell Biochem* **92**:514-24.



22. **Castro, M. E., I. Ferrer, A. Cascon, M. V. Guijarro, M. Lleonart, S. Ramon y Cajal, J. F. Leal, M. Robledo, and A. Carnero.** 2008. PPP1CA contributes to the senescence program induced by oncogenic Ras. *Carcinogenesis* **29**:491-9.
23. **Cavenee, W. K., T. P. Dryja, R. A. Phillips, W. F. Benedict, R. Godbout, B. L. Gallie, A. L. Murphree, L. C. Strong, and R. L. White.** 1983. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**:779-84.
24. **Cerda, M. C., S. Berrios, R. Fernandez-Donoso, S. Garagna, and C. Redi.** 1999. Organisation of complex nuclear domains in somatic mouse cells. *Biol Cell* **91**:55-65.
25. **Classon, M., and E. Harlow.** 2002. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* **2**:910-7.
26. **Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Barbacid, D. Beach, and M. Serrano.** 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**:642.
27. **Collado, M., and M. Serrano.** 2006. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* **6**:472-6.
28. **Chan, T. A., H. Hermeking, C. Lengauer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1999. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**:616-20.
29. **Chang, B. D., M. E. Swift, M. Shen, J. Fang, E. V. Broude, and I. B. Roninson.** 2002. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:389-94.
30. **Chau, B. N., and J. Y. Wang.** 2003. Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer* **3**:130-8.
31. **Chen, Q., A. Fischer, J. D. Reagan, L. J. Yan, and B. N. Ames.** 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4337-41.
32. **Chen, Z., L. C. Trotman, D. Shaffer, H. K. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo, and P. P.**

- Pandolfi.** 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**:725-30.
33. **Christofori, G., and H. Semb.** 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* **24**:73-6.
  34. **d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter, and S. P. Jackson.** 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**:194-8.
  35. **de Stanchina, E., M. E. McCurrach, F. Zindy, S. Y. Shieh, G. Ferbeyre, A. V. Samuelson, C. Prives, M. F. Roussel, C. J. Sherr, and S. W. Lowe.** 1998. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* **12**:2434-42.
  36. **DeGregori, J.** 2002. The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta* **1602**:131-50.
  37. **Dessaige, F., X. Cayla, J. P. Albar, A. Fleischer, A. Ghadiri, M. Duhamel, and A. Rebollo.** 2006. Identification of PP1alpha as a caspase-9 regulator in IL-2 deprivation-induced apoptosis. *J Immunol* **177**:2441-51.
  38. **Di Leonardo, A., S. P. Linke, K. Clarkin, and G. M. Wahl.** 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**:2540-51.
  39. **Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna.** 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**:638-42.
  40. **Dimri, G. P., K. Itahana, M. Acosta, and J. Campisi.** 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* **20**:273-85.
  41. **Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al.** 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:9363-7.
  42. **Dirac, A. M., and R. Bernards.** 2003. Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J Biol Chem* **278**:11731-4.

43. **Dou, Q. P., B. An, and P. L. Will.** 1995. Induction of a retinoblastoma phosphatase activity by anticancer drugs accompanies p53-independent G1 arrest and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:9019-23.
44. **Efeyan, A., I. Garcia-Cao, D. Herranz, S. Velasco-Miguel, and M. Serrano.** 2006. Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* **443**:159.
45. **Eguchi, T., T. Takaki, H. Itadani, and H. Kotani.** 2007. RB silencing compromises the DNA damage-induced G2/M checkpoint and causes deregulated expression of the ECT2 oncogene. *Oncogene* **26**:509-20.
46. **el-Deiry, W. S.** 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* **8**:345-57.
47. **Fan, S., J. K. Chang, M. L. Smith, D. Duba, A. J. Fornace, Jr., and P. M. O'Connor.** 1997. Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. *Oncogene* **14**:2127-36.
48. **Feng, J., Z. Yan, A. Ferreira, K. Tomizawa, J. A. Liauw, M. Zhuo, P. B. Allen, C. C. Ouimet, and P. Greengard.** 2000. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9287-92.
49. **Fidler, I. J.** 2002. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* **12**:89-96.
50. **Fini, L., M. Selgrad, V. Fogliano, G. Graziani, M. Romano, E. Hotchkiss, Y. A. Daoud, E. B. De Vol, C. R. Boland, and L. Ricciardiello.** 2007. Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells. *J Nutr* **137**:2622-8.
51. **Futter, M., K. Uematsu, S. A. Bullock, Y. Kim, H. C. Hemmings, Jr., A. Nishi, P. Greengard, and A. C. Nairn.** 2005. Phosphorylation of spinophilin by ERK and cyclin-dependent PK 5 (Cdk5). *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:3489-94.
52. **Gabellini, C., D. Del Bufalo, and G. Zupi.** 2006. Involvement of RB gene family in tumor angiogenesis. *Oncogene* **25**:5326-32.
53. **Giaccia, A. J., and M. B. Kastan.** 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* **12**:2973-83.
54. **Gilks, C. B., B. C. Vanderhyden, S. Zhu, M. van de Rijn, and T. A. Longacre.** 2005. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol* **96**:684-94.

55. **Goel, M., W. Sinkins, A. Keightley, M. Kinter, and W. P. Schilling.** 2005. Proteomic analysis of TRPC5- and TRPC6-binding partners reveals interaction with the plasmalemmal Na(+)/K(+)-ATPase. *Pflugers Arch* **451**:87-98.
56. **Graham, F. L., and A. J. van der Eb.** 1973. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**:536-9.
57. **Greider, C. W., and E. H. Blackburn.** 1996. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* **274**:92-7.
58. **Grossman, S. D., L. C. Hsieh-Wilson, P. B. Allen, A. C. Nairn, and P. Greengard.** 2002. The actin-binding domain of spinophilin is necessary and sufficient for targeting to dendritic spines. *Neuromolecular Med* **2**:61-9.
59. **Gu, W., and R. G. Roeder.** 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**:595-606.
60. **Hampel, B., F. Malisan, H. Niederegger, R. Testi, and P. Jansen-Durr.** 2004. Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Exp Gerontol* **39**:1713-21.
61. **Hanahan, D., and R. A. Weinberg.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
62. **Harbour, J. W., R. X. Luo, A. Dei Santi, A. A. Postigo, and D. C. Dean.** 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**:859-69.
63. **Harley, C. B., A. B. Futcher, and C. W. Greider.** 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**:458-60.
64. **Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge.** 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**:805-16.
65. **Harris, S. L., and A. J. Levine.** 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**:2899-908.
66. **Hayflick, L.** 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**:614-36.

67. **Helps, N. R., H. M. Barker, S. J. Elledge, and P. T. Cohen.** 1995. Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53. *FEBS Lett* **377**:295-300.
68. **Herbig, U., W. A. Jobling, B. P. Chen, D. J. Chen, and J. M. Sedivy.** 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14**:501-13.
69. **Honda, R., H. Tanaka, and H. Yasuda.** 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**:25-7.
70. **Hsieh-Wilson, L. C., P. B. Allen, T. Watanabe, A. C. Nairn, and P. Greengard.** 1999. Characterization of the neuronal targeting protein spinophilin and its interactions with protein phosphatase-1. *Biochemistry* **38**:4365-73.
71. **Hsieh-Wilson, L. C., F. Benfenati, G. L. Snyder, P. B. Allen, A. C. Nairn, and P. Greengard.** 2003. Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments. *J Biol Chem* **278**:1186-94.
72. **Irwin, M., M. C. Marin, A. C. Phillips, R. S. Seelan, D. I. Smith, W. Liu, E. R. Flores, K. Y. Tsai, T. Jacks, K. H. Vousden, and W. G. Kaelin, Jr.** 2000. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**:645-8.
73. **Johnson, D. G., W. D. Cress, L. Jakoi, and J. R. Nevins.** 1994. Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12823-7.
74. **Johnson, D. G., and J. Degregori.** 2006. Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Curr Mol Med* **6**:731-8.
75. **Kamijo, T., F. Zindy, M. F. Roussel, D. E. Quelle, J. R. Downing, R. A. Ashmun, G. Grosveld, and C. J. Sherr.** 1997. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**:649-59.
76. **Kim, N. W., M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, and J. W. Shay.** 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**:2011-5.
77. **Kim, S., H. Takahashi, W. W. Lin, P. Descargues, S. Grivennikov, Y. Kim, J. L. Luo, and M. Karin.** 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**:102-6.

78. **Knudsen, E. S., and K. E. Knudsen.** 2008. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. *Nat Rev Cancer* **8**:714-24.
79. **Knudsen, K. E., D. Booth, S. Naderi, Z. Sever-Chroneos, A. F. Fribourg, I. C. Hunton, J. R. Feramisco, J. Y. Wang, and E. S. Knudsen.** 2000. RB-dependent S-phase response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **20**:7751-63.
80. **Kurschat, P., and C. Mauch.** 2000. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol* **25**:482-9.
81. **Leal, J. F., J. Fominaya, A. Cascon, M. V. Guijarro, C. Blanco-Aparicio, M. Lleonart, M. E. Castro, Y. C. S. Ramon, M. Robledo, D. H. Beach, and A. Carnero.** 2008. Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes. *Oncogene* **27**:1961-70.
82. **Lee, S. J., R. D. Romeo, P. Svenningsson, C. R. Campomanes, P. B. Allen, P. Greengard, and B. S. McEwen.** 2004. Estradiol affects spinophilin protein differently in gonadectomized males and females. *Neuroscience* **127**:983-8.
83. **Levine, A. J.** 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**:323-31.
84. **Li, B., K. L. Murphy, R. Laucirica, F. Kittrell, D. Medina, and J. M. Rosen.** 1998. A transgenic mouse model for mammary carcinogenesis. *Oncogene* **16**:997-1007.
85. **Lin, A. W., M. Barradas, J. C. Stone, L. van Aelst, M. Serrano, and S. W. Lowe.** 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* **12**:3008-19.
86. **Liu, C. W., R. H. Wang, and N. Berndt.** 2006. Protein phosphatase 1alpha activity prevents oncogenic transformation. *Mol Carcinog* **45**:648-56.
87. **Ludlow, J. W., C. L. Glendening, D. M. Livingston, and J. A. DeCarprio.** 1993. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **13**:367-72.
88. **Luo, J. L., W. Tan, J. M. Ricono, O. Korchynskyi, M. Zhang, S. L. Gonias, D. A. Cheresh, and M. Karin.** 2007. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* **446**:690-4.

89. **Macaluso, M., M. Montanari, and A. Giordano.** 2006. Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene* **25**:5263-7.
90. **MacMillan, L. B., M. A. Bass, N. Cheng, E. F. Howard, M. Tamura, S. Strack, B. E. Wadzinski, and R. J. Colbran.** 1999. Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J Biol Chem* **274**:35845-54.
91. **Mantovani, A.** 2009. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* **457**:36-7.
92. **Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill.** 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**:436-44.
93. **Martins, C. P., L. Brown-Swigart, and G. I. Evan.** 2006. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* **127**:1323-34.
94. **Marx, S. O., S. Reiken, Y. Hisamatsu, M. Gaburjakova, J. Gaburjakova, Y. M. Yang, N. Rosemlit, and A. R. Marks.** 2001. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol* **153**:699-708.
95. **Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi, and D. S. Peeper.** 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**:720-4.
96. **Moiseeva, O., F. A. Mallette, U. K. Mukhopadhyay, A. Moores, and G. Ferbeyre.** 2006. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Mol Biol Cell* **17**:1583-92.
97. **Munro, J., N. I. Barr, H. Ireland, V. Morrison, and E. K. Parkinson.** 2004. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp Cell Res* **295**:525-38.
98. **Narita, M., S. Nunez, E. Heard, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon, and S. W. Lowe.** 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**:703-16.

99. **Nelson, D. A., N. A. Krucher, and J. W. Ludlow.** 1997. High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* **272**:4528-35.
100. **Nevins, J. R.** 2001. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10**:699-703.
101. **Nowell, P. C.** 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**:23-8.
102. **Ogryzko, V. V., T. H. Hirai, V. R. Russanova, D. A. Barbie, and B. H. Howard.** 1996. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol* **16**:5210-8.
103. **Okamoto, A., D. J. Demetrick, E. A. Spillare, K. Hagiwara, S. P. Hussain, W. P. Bennett, K. Forrester, B. Gerwin, M. Serrano, D. H. Beach, and et al.** 1994. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:11045-9.
104. **Palmero, I., C. Pantoja, and M. Serrano.** 1998. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* **395**:125-6.
105. **Penzes, P., R. C. Johnson, R. Sattler, X. Zhang, R. L. Huganir, V. Kambampati, R. E. Mains, and B. A. Eipper.** 2001. The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron* **29**:229-42.
106. **Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N. J. Liegeois, A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K. Chen, I. Orlov, H. W. Lee, C. Cordon-Cardo, and R. A. DePinho.** 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**:713-23.
107. **Prives, C., and P. A. Hall.** 1999. The p53 pathway. *J Pathol* **187**:112-26.
108. **Qin, X. Q., D. M. Livingston, W. G. Kaelin, Jr., and P. D. Adams.** 1994. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:10918-22.
109. **Radich, J. P., H. Dai, M. Mao, V. Oehler, J. Schelter, B. Druker, C. Sawyers, N. Shah, W. Stock, C. L. Willman, S. Friend, and P. S. Linsley.** 2006. Gene



expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2794-9.

110. **Radtke, F., and K. Raj.** 2003. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* **3**:756-67.
111. **Rhodes, D. R., J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey, and A. M. Chinnaiyan.** 2004. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* **6**:1-6.
112. **Richman, J. G., A. E. Brady, Q. Wang, J. L. Hensel, R. J. Colbran, and L. E. Limbird.** 2001. Agonist-regulated Interaction between alpha2-adrenergic receptors and spinophilin. *J Biol Chem* **276**:15003-8.
113. **Roninson, I. B.** 2002. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* **179**:1-14.
114. **Roninson, I. B.** 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* **63**:2705-15.
115. **Roth, J., M. Dobbelstein, D. A. Freedman, T. Shenk, and A. J. Levine.** 1998. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J* **17**:554-64.
116. **Rowland, B. D., and D. S. Peeper.** 2006. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**:11-23.
117. **Rubin, E., S. Mittnacht, E. Villa-Moruzzi, and J. W. Ludlow.** 2001. Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene* **20**:3776-85.
118. **Rubin, E., S. Tamrakar, and J. W. Ludlow.** 1998. Protein phosphatase type 1, the product of the retinoblastoma susceptibility gene, and cell cycle control. *Front Biosci* **3**:D1209-19.
119. **Ruiz, L., M. Traskine, I. Ferrer, E. Castro, J. F. Leal, M. Kaufman, and A. Carnero.** 2008. Characterization of the p53 response to oncogene-induced senescence. *PLoS ONE* **3**:e3230.

120. **Ryan, X. P., J. Alldritt, P. Svenningsson, P. B. Allen, G. Y. Wu, A. C. Nairn, and P. Greengard.** 2005. The Rho-specific GEF Lfc interacts with neurabin and spinophilin to regulate dendritic spine morphology. *Neuron* **47**:85-100.
121. **Sagara, M., Y. Kawasaki, S. I. Iemura, T. Natsume, Y. Takai, and T. Akiyama.** 2009. Asef2 and Neurabin2 cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in HGF-induced cell migration. *Oncogene* **28**:1357-65.
122. **Sage, J., A. L. Miller, P. A. Perez-Mancera, J. M. Wysocki, and T. Jacks.** 2003. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424**:223-8.
123. **Sakisaka, T., H. Nakanishi, K. Takahashi, K. Mandai, M. Miyahara, A. Satoh, K. Takaishi, and Y. Takai.** 1999. Different behavior of I-afadin and neurabin-II during the formation and destruction of cell-cell adherens junction. *Oncogene* **18**:1609-17.
124. **Sanseverino, F., R. Santopietro, M. Torricelli, G. D'Andrilli, G. Russo, G. Cevenini, A. Bovicelli, L. Leoncini, G. Scambia, F. Petraglia, P. P. Claudio, and A. Giordano.** 2006. pRb2/p130 and VEGF expression in endometrial carcinoma in relation to angiogenesis and histopathologic tumor grade. *Cancer Biol Ther* **5**:84-8.
125. **Santra, M., X. Zhang, S. Santra, F. Jiang, and M. Chopp.** 2006. Ectopic doublecortin gene expression suppresses the malignant phenotype in glioblastoma cells. *Cancer Res* **66**:11726-35.
126. **Sarrouilhe, D., A. di Tommaso, T. Metaye, and V. Ladeveze.** 2006. Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie* **88**:1099-113.
127. **Satoh, A., H. Nakanishi, H. Obaishi, M. Wada, K. Takahashi, K. Satoh, K. Hirao, H. Nishioka, Y. Hata, A. Mizoguchi, and Y. Takai.** 1998. Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J Biol Chem* **273**:3470-5.
128. **Schmitt, C. A., J. S. Fridman, M. Yang, S. Lee, E. Baranov, R. M. Hoffman, and S. W. Lowe.** 2002. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109**:335-46.

129. **Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, and S. W. Lowe.** 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**:593-602.
130. **Seshadri, T., and J. Campisi.** 1990. Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* **247**:205-9.
131. **Shay, J. W., and W. E. Wright.** 2005. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**:867-74.
132. **Shelton, D. N., E. Chang, P. S. Whittier, D. Choi, and W. D. Funk.** 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* **9**:939-45.
133. **Shieh, S. Y., M. Ikeda, Y. Taya, and C. Prives.** 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**:325-34.
134. **Siegel, P. M., and J. Massague.** 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**:807-21.
135. **Singh, P., S. H. Wong, and W. Hong.** 1994. Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation. *Embo J* **13**:3329-38.
136. **Skapek, S. X., Y. R. Pan, and E. Y. Lee.** 2006. Regulation of cell lineage specification by the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene* **25**:5268-76.
137. **Smith, F. D., G. S. Oxford, and S. L. Milgram.** 1999. Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *J Biol Chem* **274**:19894-900.
138. **Stephens, D. J., and G. Banting.** 1999. Direct interaction of the trans-Golgi network membrane protein, TGN38, with the F-actin binding protein, neurabin. *J Biol Chem* **274**:30080-6.
139. **Tamrakar, S., E. Rubin, and J. W. Ludlow.** 2000. Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* **5**:D121-37.
140. **te Poele, R. H., A. L. Okorokov, L. Jardine, J. Cummings, and S. P. Joel.** 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **62**:1876-83.
141. **Terry-Lorenzo, R. T., L. C. Carmody, J. W. Voltz, J. H. Connor, S. Li, F. D. Smith, S. L. Milgram, R. J. Colbran, and S. Shenolikar.** 2002. The neuronal

actin-binding proteins, neurabin I and neurabin II, recruit specific isoforms of protein phosphatase-1 catalytic subunits. *J Biol Chem* **277**:27716-24.

142. **Terry-Lorenzo, R. T., E. Elliot, D. C. Weiser, T. D. Prickett, D. L. Brautigan, and S. Shenolikar.** 2002. Neurabins recruit protein phosphatase-1 and inhibitor-2 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **277**:46535-43.
143. **Tsukada, M., A. Prokscha, J. Oldekamp, and G. Eichele.** 2003. Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech Dev* **120**:1033-43.
144. **Tsukada, M., A. Prokscha, E. Ungewickell, and G. Eichele.** 2005. Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J Biol Chem* **280**:11361-8.
145. **Vassilev, L. T., B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, and E. A. Liu.** 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**:844-8.
146. **Veikkola, T., and K. Alitalo.** 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* **9**:211-20.
147. **Venable, M. E., J. Y. Lee, M. J. Smyth, A. Bielawska, and L. M. Obeid.** 1995. Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* **270**:30701-8.
148. **Ventura, A., D. G. Kirsch, M. E. McLaughlin, D. A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E. E. Reczek, R. Weissleder, and T. Jacks.** 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**:661-5.
149. **Vivo, M., R. A. Calogero, F. Sansone, V. Calabro, T. Parisi, L. Borrelli, S. Saviozzi, and G. La Mantia.** 2001. The human tumor suppressor arf interacts with spinophilin/neurabin II, a type 1 protein-phosphatase-binding protein. *J Biol Chem* **276**:14161-9.
150. **Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine.** 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**:307-10.
151. **Wagner, M., G. Brosch, W. Zwerschke, E. Seto, P. Loidl, and P. Jansen-Durr.** 2001. Histone deacetylases in replicative senescence: evidence for a senescence-specific form of HDAC-2. *FEBS Lett* **499**:101-6.

152. **Wahl, G. M., S. P. Linke, T. G. Paulson, and L. C. Huang.** 1997. Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv* **29**:183-219.
153. **Wang, Q., and L. E. Limbird.** 2002. Regulated interactions of the alpha 2A adrenergic receptor with spinophilin, 14-3-3zeta, and arrestin 3. *J Biol Chem* **277**:50589-96.
154. **Wang, R. H., C. W. Liu, V. I. Avramis, and N. Berndt.** 2001. Protein phosphatase 1alpha-mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncogene* **20**:6111-22.
155. **Wang, X., W. Zeng, A. A. Soyombo, W. Tang, E. M. Ross, A. P. Barnes, S. L. Milgram, J. M. Penninger, P. B. Allen, P. Greengard, and S. Muallem.** 2005. Spinophilin regulates Ca<sup>2+</sup> signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors. *Nat Cell Biol* **7**:405-11.
156. **Wu, X., and A. J. Levine.** 1994. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3602-6.
157. **Xue, W., L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe.** 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**:656-60.
158. **Yan, Z., L. Hsieh-Wilson, J. Feng, K. Tomizawa, P. B. Allen, A. A. Fienberg, A. C. Nairn, and P. Greengard.** 1999. Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat Neurosci* **2**:13-7.
159. **Yeager, T., W. Stadler, C. Belair, J. Puthenveetil, O. Olopade, and C. Reznikoff.** 1995. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. *Cancer Res* **55**:493-7.
160. **Yoon, I. K., H. K. Kim, Y. K. Kim, I. H. Song, W. Kim, S. Kim, S. H. Baek, J. H. Kim, and J. R. Kim.** 2004. Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Exp Gerontol* **39**:1369-78.

161. **Yoon, S. O., S. Shin, and A. M. Mercurio.** 2006. Ras stimulation of E2F activity and a consequent E2F regulation of integrin alpha6beta4 promote the invasion of breast carcinoma cells. *Cancer Res* **66**:6288-95.
162. **Zhang, J., C. R. Pickering, C. R. Holst, M. L. Gauthier, and T. D. Tlsty.** 2006. p16INK4a modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **66**:10325-31.
163. **Zhu, J., D. Woods, M. McMahon, and J. M. Bishop.** 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* **12**:2997-3007.













